

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ACTION MORPHOGÈNE DE FACTEURS VITAMINIQUES SUR CERTAINS CHAMPIGNONS

par J. MAGROU (*), H. MARNEFFE et F. MARIAT.

(Institut Pasteur. Service de Mycologie et Physiologie végétale.)

Dans une note antérieure [6], nous avons signalé les propriétés physiologiques d'un champignon Hyphomycète nouveau de la famille des Stilbacées. Ce champignon avait été isolé, de façon tout à fait fortuite, sur un milieu nutritif gélosé, renfermant des sels minéraux, et, pour 1 000 cm³, 15 g de glucose, 1,88 mg d'aneurine (thiamine ou vitamine B₁) et 0,001 mg d'acide indole- β -acétique. Il est caractérisé par ses fructifications corémiées, disposées en cercles concentriques, formées d'un stipe fibreux, brun, rigide, constitué par des faisceaux d'hyphes enroulés en spirale. Le stipe est surmonté d'une tête subsphérique, d'abord jaune, puis verte (fig. 1 de la planche), dont les hyphes portent des conidies lisses, ovoïdes ou sphériques, acropleurogènes, s'insérant sur le filament sporifère par l'intermédiaire d'un fin stérigmate. Nous avons donné ailleurs [2, 5], sous le nom de *Sphaerocybe concentrica* n. g. n. sp., Magrou et Marneffe, 1945, une description détaillée de cet organisme, accompagnée d'une diagnose latine. Il s'agit d'une Stilbacée appartenant à la sous-

(*) La mort a surpris le Professeur Magrou en pleine activité. Ces *Annales* publient le dernier mémoire qu'il ait rédigé, suivi de notes sur les travaux qu'il dirigeait et que ses élèves ont groupées dans ce même numéro en hommage au Maître disparu.

N. D. L. R.

famille des Phæostilbées, section des Amérosporées, sous-section des Hyalosporées.

Ayant repiqué ce champignon, pour en conserver la souche, sur gélose peptonée glucosée, nous avons constaté, à notre grande surprise, qu'il ne donnait sur ce milieu qu'un thalle stérile, complètement dépourvu des corémies caractéristiques, et dans lequel un examen microscopique minutieux ne révéla pas la moindre trace de conidies. Devant ce résultat inattendu, nous nous sommes demandé si la production des corémies ne serait pas liée à la présence d'aneurine ou d'acide indole- β -acétique dans le milieu où le champignon s'était développé primitivement. Pour nous en assurer, nous l'avons repiqué sur milieu minéral sans glucose (1), sur milieu minéral glucosé à 15 p. 1 000, additionné ou non d'aneurine ou d'acide indole- β -acétique aux doses indiquées plus haut, ou de ces deux produits en mélange. L'expérience s'est montrée concluante : le glucose est indispensable au développement du thalle, l'acide indole- β -acétique stimule nettement sa croissance, mais ni l'un ni l'autre de ces produits n'est capable d'engendrer les corémies. C'est seulement dans les milieux renfermant de l'aneurine que celles-ci se développent en abondance, avec leur forme et leur disposition caractéristiques (fig. 2 à 5 et 7 de la planche).

Partant de là, nous avons cherché si notre champignon était capable d'opérer la synthèse de l'aneurine à partir des constituants de cette vitamine, la pyrimidine et le thiazole. A cet effet, nous avons étudié son comportement en présence de ces corps, isolés ou associés. Dans nos premières expériences, exécutées en 1944 avec un échantillon de thiazole de l'aneurine que nous nous étions procuré à cette époque, nous avions obtenu une production régulière de corémies en présence de ce composé. Mais l'expérience, refaite récemment avec un nouvel échantillon de thiazole, ne nous a plus donné le même résultat. L'aspect morphologique actuel de notre souche de *S. concentrica* semble indiquer qu'une mutation s'est produite depuis nos premières expériences. Cette nouvelle épreuve nous amène donc à réviser nos conclusions antérieures sur le pouvoir corémigène du thiazole. Par contre, il s'est confirmé que ce composé, lorsqu'il est associé à la pyrimidine, provoque la formation de corémies. Le champignon est donc, pour le moins, capable d'opérer la synthèse de l'aneurine à partir d'un mélange de pyrimidine et de thiazole. Quant à la pyrimidine de l'aneurine, elle est, à elle seule, dépourvue de pouvoir d'engendrer des corémies.

Nous nous sommes appliqués ensuite à déterminer le seuil de

(1) Pour la composition de ce milieu, nous renvoyons à nos publications antérieures.

l'activité corémigène de l'aneurine. Dans une première série d'essais [5, 6], nous avons constaté une abondante production de corémies à des concentrations en aneurine s'échelonnant entre 0,04 mg et 90 mg par litre. D'où la nécessité, pour résoudre le problème, de recourir à une échelle de dilutions beaucoup plus étendue. Nous avons donc fait un grand nombre de cultures sur milieu minéral glucosé, sans aneurine ou renfermant de l'aneurine respectivement aux concentrations de 1.10^{-7} , 1.10^{-8} , 1.10^{-9} , 1.10^{-10} , 1.10^{-11} , 1.10^{-12} , 1.10^{-13} , 1.10^{-14} et 1.10^{-15} . Pour éliminer les facteurs de croissance qui pouvaient être apportés éventuellement par le coton servant à boucher les tubes ou par la gélose, nous avons fait une partie de ces cultures dans des tubes simplement bouchés par un capuchon de verre stérilisé et sur un substratum constitué par une bande de papier Berzélius, plongeant par sa partie inférieure dans la solution nutritive. Dans une autre série d'essais, nous avons employé du glucose traité par le charbon activé (norite), destiné à adsorber les vitamines que ce glucide peut renfermer à titre d'impuretés. Ces divers essais ont donné des résultats concordants : dans les cultures témoins sans aneurine, ou dans les tubes renfermant de l'aneurine aux concentrations comprises entre 1.10^{-9} et 1.10^{-15} , il ne s'est pas formé de corémies ; tout au plus, dans quelques tubes, a-t-on pu voir le mycélium s'agréger en aiguillons qui n'ont pas tardé à avorter, sans avoir produit de têtes sporifères. Par contre, à 1.10^{-8} et aux concentrations supérieures, des corémies se sont produites en abondance. C'est donc aux concentrations comprises entre 1.10^{-8} et 1.10^{-9} qu'est situé le seuil d'activité de la vitamine. Pour le préciser, nous avons fait de nouvelles cultures, à des concentrations en aneurine respectivement égales à 1.10^{-8} , 9.10^{-9} , 8.10^{-9} , 7.10^{-9} , 6.10^{-9} , 5.10^{-9} , 4.10^{-9} , 3.10^{-9} , 2.10^{-9} , 1.10^{-9} . Aux concentrations de 3.10^{-9} et au-dessous, les corémies manquent ou sont en petit nombre ; à partir de la concentration 4.10^{-9} , elles se produisent en abondance. La concentration minimum d'aneurine permettant la formation abondante de corémies bien différenciées du *Sphærocyste* est donc 4.10^{-9} .

★ ★

Ainsi, la production des corémies du *S. concentrica* est liée à la présence, dans le milieu de culture, d'une quantité suffisante d'aneurine, que la molécule d'aneurine soit offerte toute constituée au champignon, ou que l'on mette à la disposition de celui-ci un mélange des deux constituants de cette vitamine, pyrimidine et thiazole. Partant de là, nous avons tenté d'obtenir la production des corémies dans un milieu renfermant de la pyrimidine mais dépourvu de thiazole, en associant au *Sphærocyste* un champignon

producteur de thiazole [4]. Déjà MM. Müller et Schopfer [41], en associant sur des milieux synthétiques, sans facteurs de croissance, une levure rouge (*Rhodotorula rubra*) et une Mucorinée (*Mucor ramannianus*), avaient obtenu le développement normal de ces deux champignons qui, cultivés séparément, exigent, pour se développer, le premier de la pyrimidine, le second du thiazole. Ces auteurs en concluent que chacun des partenaires fournit à l'autre le constituant manquant, *Rhodotorula rubra* synthétisant le thiazole et *Mucor ramannianus* la pyrimidine. « Il s'agit donc, écrivent-ils, d'un cas parfaitement caractérisé de symbiose artificielle, conditionnée par les facteurs de croissance. »

Nous inspirant de cette expérience, nous avons cultivé simultanément, sur un milieu synthétique dépourvu de thiazole, *Rhodotorula rubra* et *Sphærocybe concentrica*, avec l'espoir que le thiazole synthétisé par la levure entraînerait, en présence de pyrimidine, la formation des corémies de la Stilbacée. Les résultats de l'expérience se sont montrés conformes à cette prévision.

Après tâtonnements, nous avons adopté le milieu de culture suivant, également favorable à la croissance des deux champignons :

Asparagine.	0,250 g
SO ₄ Mg, 7H ₂ O.	0,50 g
SO ₄ Na ₂ , 10H ₂ O.	0,40 g
NO ₃ K.	0,40 g
PO ₄ KH ₂	0,40 g
CaCl ₂	0,40 g
Tartrate neutre de K.	0,40 g
FeCl ₃	Traces.
Glucose	24 g
Pyrimidine.	1 mg
Gélose lavée	15 g
Eau bidistillée.	1 000 g

Les cellules de la levure et les conidies du *Sphærocybe* ont étéensemencées soit en mélange, en un point unique du tube de culture, soit séparément, en deux points distants de quelques centimètres, sur une même plaque de gélose coulée en boîte de Petri ou en boîte triangulaire de Pinoy (2). Dans le premier cas, la levure se développe d'abord, formant une belle colonie rouge, à la surface de laquelle le mycélium du *Sphærocybe* ne tarde pas à apparaître ; ce mycélium développe, au bout de quelques jours, des corémies, sous forme d'aiguillons bruns à pointes jaunes qui s'épanouissent en une tête jaune virant au vert au moment de la sporulation. Dans le second cas, les colonies des deux champignons, par suite de leur croissance, progressent l'une vers l'autre ;

(2) La culture de *Rhodotorula*, utilisée dans ces expériences, est due à l'obligeance de M. Schopfer, à qui nous adressons nos très vifs remerciements.

quand le *Sphærocybe* n'est plus distant de la levure que de 1 mm environ, son mode de végétation change ; le mycélium devient duveteux dans la région de la colonie la plus proche du *Rhodotorula*. Enfin, quand les deux colonies se rejoignent, des corémies typiques se développent, suivant le mode ordinaire, tout le long de la ligne où la jonction s'est accomplie (fig. 6 et 8 de la planche). Dans les cultures témoins, où chacun des deux champignons est cultivé isolément à l'exclusion de l'autre, le *R. rubra* se développe normalement, et le *Sphærocybe* croît sous forme de mycélium stérile, sans trace de corémies.

On peut en conclure que, dans les conditions de l'expérience, le *Sphærocybe*, à partir du thiazole synthétisé par la levure rouge et de la pyrimidine présente dans le milieu, réalise la synthèse de l'aneurine en quantité suffisante pour assurer une production normale de corémies. Il s'agit là d'un cas de symbiose morphogène, où l'un des deux partenaires fournit à l'autre le produit nécessaire à sa fructification.

Dans cette expérience, la culture en symbiose avec le *Rhodotorula* détermine la formation des appareils conidiens du *Sphærocybe*. Nous nous sommes demandé si la symbiose ne pourrait pas favoriser de même la production de formes parfaites de fructification. Pour le vérifier, l'un de nous [9] s'est adressé au *Sordaria fimicola*, Sphériale qui, d'après MM. Lilly et Barnett [4], aurait besoin, pour produire ses périthèces, de divers facteurs de croissance (biotine en particulier). Ce champignon, conservé au laboratoire sur un milieu synthétique ne contenant comme seule vitamine que de l'aneurine à la concentration de 1.10^{-6} , produit sur ce milieu des périthèces nombreux renfermant des asques et des ascospores mûrs (3).

Le milieu de culture suivant, réparti en boîtes de Petri, a été adopté :

SO ₄ Mg, 7H ₂ O	0,5 g
SO ₄ Na ₂ , 10H ₂ O	0,5 g
NO ₃ K	0,5 g
Tartrate neutre de K	0,5 g
PO ₄ KH ₂	0,5 g
CaCl ₂	0,5 g
FeCl ₃	Traces.
Glucose pur anhydre	15 g
Gélose lavée	15 g
Eau bidistillée dans le verre pyrex.	1 000 g

Le *Sordaria fimicola* et le *Sphærocybe concentrica* sont ensemencés sur ce milieu suivant deux lignes distantes d'environ 2 cm.

(3) Dans ces conditions de culture, on peut supposer que la gélose du milieu fournit de la biotine en quantité suffisante pour permettre, en présence d'aneurine, la fructification du champignon.

Un certain nombre de boîtes de Petri témoins ne sontensemencées qu'avec un seul des deux champignons.

Dans toutes les boîtes où les deux champignons sont en présence, le mycélium du *Sphærocybe*, lorsqu'il arrive au contact du *Sordaria*, devient duveteux et ne tarde pas à produire les corémies typiques, qui se développent selon le mode ordinaire. Pendant ce temps, le *Sordaria* croît abondamment en un mycélium qui se pigmente fortement en noir au contact et au voisinage immédiat du *Sphærocybe*. On observe également, en dehors de la zone de contact, la formation de points noirs qui semblent être des ébauches de périthèces. Dans une seule boîte de Petri, il y a eu formation de périthèces contenant des asques et des ascospores mûrs. Dans les boîtes où le *Sphærocybe* est cultivé seul, le mycélium se développe abondamment, donnant un thalle à surface brune, mais les corémies font toujours totalement défaut. Dans les boîtes témoins où le *Sordaria* est cultivé seul, il ne manifeste qu'une très faible croissance, en développant lentement un mycélium peu abondant, qui n'est jamais pigmenté. Même après soixante jours de culture on n'observe pas la formation de points noirs.

Dans les cultures associées des deux champignons, le *Sphærocybe* fournit au *Sordaria* les facteurs nécessaires à sa croissance, à sa pigmentation, et, éventuellement, au développement de ses formes parfaites de fructification, et lui-même produit ses corémies, sous l'action des vitamines élaborées par la Sphériacée. De nouvelles épreuves seront nécessaires pour préciser la nature des facteurs en cause.

Ces deux dernières expériences fournissent des exemples de symbiose morphogène, où l'un des partenaires procure à l'autre les produits nécessaires à sa fructification.

On connaît, dans le règne végétal, de nombreux exemples de biomorphoses en liaison avec des phénomènes de symbiose : formation de nodules radicaux ou foliaires chez les plantes associées à des bactéries symbiotiques ; particularités morphologiques du thalle des Lichens ; racines coralloïdes des arbres à mycorhizes ectotrophes ; production de tubercules ou d'autres organes pérennants chez les plantes à mycorhizes endotrophes. Des mécanismes physico-chimiques variés ont été invoqués en ces cas pour expliquer l'action morphogène des organismes symbiotiques. Parmi ces mécanismes, l'accroissement de la pression osmotique des humeurs de la plante paraît, dans certains cas, jouer un rôle prépondérant. C'est ainsi que des graines d'Orchidées, semées sur un milieu nutritif faiblement concentré, ne germent qu'en association avec un champignon symbiotique. Mais sur des milieux suffisamment concentrés, elles sont capables de germer sans champignon. D'où la conclusion qu'en culture symbiotique, le

champignon agit en saccharifiant l'amidon dans les cellules de l'embryon qu'il envahit. Or nous avons constaté, à diverses reprises (Magrou et Mariat [3], Mariat [7, 8, 10]) que les semis aseptiques de *Cattleya*, en solutions sucrées, prospèrent beaucoup mieux dans des milieux renfermant certaines vitamines à doses convenables : aneurine, pyrimidine, biotine, acide nicotinique, ce dernier facteur étant encore actif à de très hautes dilutions (1.10^{-10}). En culture symbiotique, le champignon agit donc vraisemblablement, non seulement en modifiant l'équilibre physico-chimique des humeurs de la plante, mais encore en fournissant à son partenaire, comme dans nos expériences de cultures associées de champignons, les facteurs nécessaires à sa croissance et à sa différenciation.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Le *Sphærocybe concentrica*. Hyphomycète nouveau de la famille des Stilbacées, ne produit ses corémies caractéristiques que sur les milieux renfermant de l'aneurine (thiamine ou vitamine B₁), ou un mélange des deux constituants de cette vitamine (pyrimidine et thiazole).

2° La concentration minimum d'aneurine permettant la formation abondante de corémies bien différenciées est de 4.10^{-9} .

3° Pour provoquer la fructification de l'Hyphomycète, on peut, soit introduire dans le milieu de culture de l'aneurine ou un mélange de pyrimidine et de thiazole, soit le cultiver dans un milieu renfermant de la pyrimidine, mais dépourvu d'aneurine ou de thiazole, en l'associant à un champignon producteur de ce dernier composé (*Rhodotorula rubra*). Dans ces conditions, les corémies se développent le long de la ligne de rencontre des colonies des deux champignons.

4° Le *Sordaria fimicola*, Ascomycète de l'ordre des Sphérialés, lorsqu'on le cultive sur un milieu dépourvu de vitamines, en association avec le *Sphærocybe concentrica*, donne un mycélium beaucoup plus abondant qu'en culture pure, pigmenté en noir, semé de points noirs qui semblent être des ébauches de périthèces, et produisant même parfois des périthèces contenant des asques et des ascospores mûrs. Dans ces cultures associées, le *Sphærocybe*, de son côté, développe ses appareils conidiens corémiés. Dans cette expérience, chacun des deux partenaires fournit à l'autre les produits nécessaires à sa fructification.

5° Deux conclusions générales se dégagent de ces diverses constatations. Elles concernent, en premier lieu, l'action morphogène que les vitamines exercent sur certains champignons, en second lieu, le rôle éventuel joué, dans les associations symbiotiques, par les vitamines que les deux partenaires peuvent mutuellement se fournir.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] V. G. LILLY et H. L. BARNETT. *Am. J. Bot.*, 1947, **34**, 131.
- [2] J. MAGROU. *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **220**, 220.
- [3] J. MAGROU et F. MARIAT. *Ces Annales*, 1945, **71**, 49.
- [4] J. MAGROU et F. MARIAT. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 981.
- [5] J. MAGROU et H. MARNEFFE. *Bull. Soc. Mycol. de France*, 1945, **61**, 5.
- [6] J. MAGROU et H. MARNEFFE. *Ces Annales*, 1946, **72**, 147.
- [7] F. MARIAT. *Thèse Sciences*, Paris, 1951.
- [8] F. MARIAT. *Rev. gén. Bot.*, 1948, **55**, 229.
- [9] F. MARIAT. *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 68.
- [10] F. MARIAT. *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, 1355.
- [11] W. MÜLLER et W. H. SCHOPFER. *C. R. Acad. Sci.*, 1937, **205**, 687.

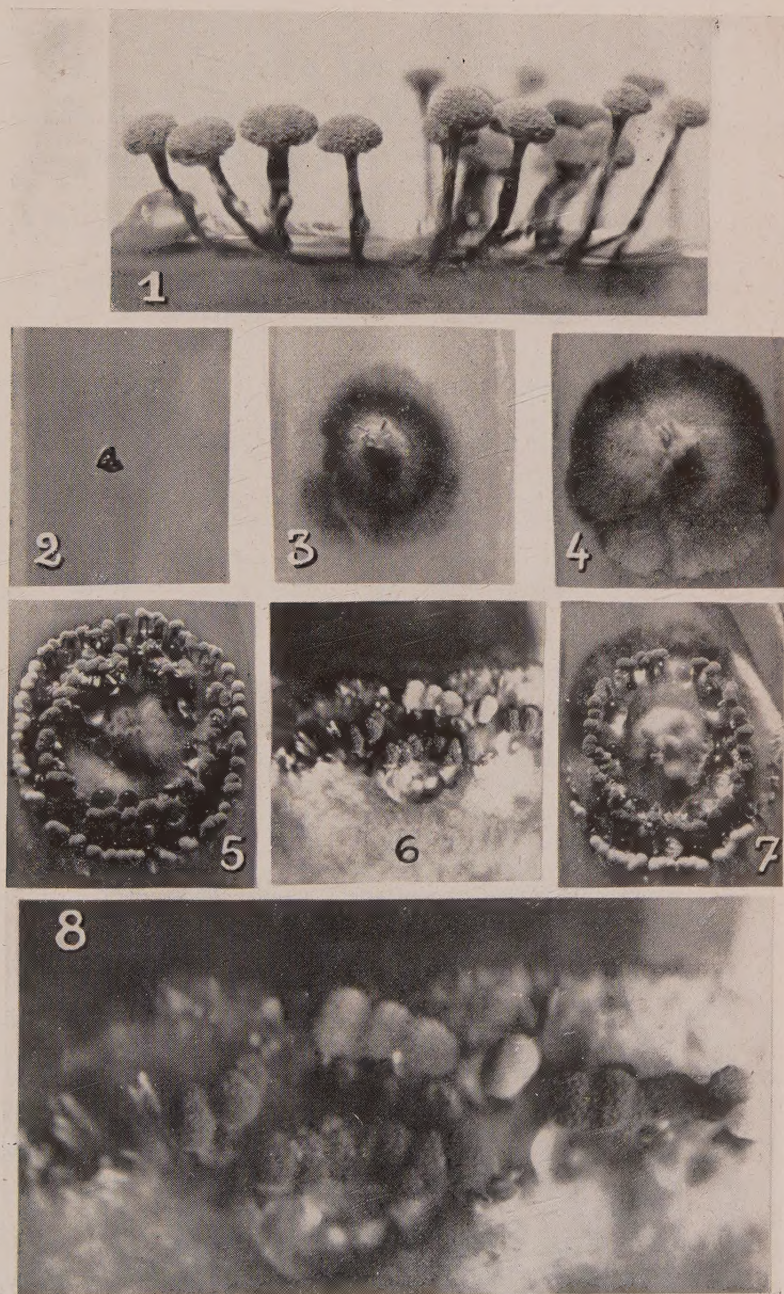
PLANCHE


FIG. 1. — Un groupe de corémies mûres de *Sphærocybe concentrica*.
Gross. : $\times 8$. Cliché Jeantet.

FIG. 2 à 5, 7. — Colonies de *Sphærocybe concentrica* sur divers milieux gélosés, montrant la formation des corémies en présence d'aneurine : 2, milieu minéral non sucré ; 3, milieu minéral glucosé à 15 p. 1 000 ; 4, milieu minéral glucosé + acide indole- β -acétique (10^{-9}) ; 5, milieu minéral glucosé + aneurine (1,88 mg par litre) ; 6, milieu minéral glucosé + acide indole- β -acétique (10^{-9}) + aneurine (1,88 mg par litre). Gross. : = 2 pour toutes les figures. Clichés Jeantet.

FIG. 6. — Colonies associées de *Sphærocybe concentrica* (en bas) et de *Rhodotorula rubra* (en haut). Les corémies stipitées à tête sphérique du *Sphærocybe* se sont différenciées le long de la ligne où le contact s'est établi entre les deux colonies. Gross. : $\times 4$. Cliché Manigault.

FIG. 8. — Détail plus grossi de la figure 6, montrant, au centre, un groupe de jeunes corémies, à tête jaune, de *S. concentrica*. De part et d'autre et au-dessous de celles-ci, corémies mûres à tête verte. Gross. : $\times 9$. Cliché Manigault.





Digitized by the Internet Archive
in 2024

CULTURE SYMBIOTIQUE DE LA POMME DE TERRE EN MONTAGNE. CONSTITUTION DE LIGNÉES PURES (*).

par J. MAGROU, G. SEGRETAI, J. BOUGET et P. SCHMIDT.

(Institut Pasteur. Service de Mycologie et Physiologie végétale.)

Afin de montrer qu'il existe une relation entre l'action favorisante de la montagne et la symbiose mycorhizienne, des cultures de Pommes de terre furent entreprises en 1933 dans les montagnes pyrénéennes des environs de Bagnères-de-Bigorre. Les pieds de Pomme de terre issus de graines et cultivés dans des champs situés entre 1 000 et 1 500 m d'altitude, où abondent les plantes à mycorhizes, produisent un grand nombre de tubercules et contractent une symbiose durable. Dans ces conditions de culture, il existe chez ces plantes une corrélation entre la symbiose mycorhizienne et la tubérisation ; en effet, l'un de nous a montré que certaines plantes, exceptionnellement non tubérisées, s'étaient affranchies de la symbiose [1].

Les terrains les plus favorables à la culture symbiotique de la Pomme de terre sont caractérisés par des associations végétales très spéciales qui constituent la riche flore de la belle châtaigneraie [2]. Au Courtalet, près de Bagnères, dans un tel terrain, des tubercules ayant les dimensions de tubercules ordinaires, sont obtenus à partir de plantes de semis [3]. Replantés dans les mêmes terrains à mycorhizes, ces tubercules fournissent en abondance de gros tubercules secondaires, qui donnent de bons rendements dans les terres de la région.

Cependant, dans les plantes issues de semis d'une variété donnée, on constate un certain manque d'homogénéité ; en effet, en vue d'obtenir des types nouveaux, les sélectionneurs ont soumis la Pomme de terre à de nombreux croisements, si bien que la plupart des variétés actuelles de cette espèce sont hétérozygotes. La reproduction par semis de graines fait donc apparaître, dans la descendance d'une variété, des types nouveaux et des retours aux caractères ancestraux que prévoit la loi de Mendel.

(*) Ce travail, effectué sous la direction de M. Magrou, n'a pas été rédigé de sa main.

Afin d'éviter cette variation, nous cherchons à obtenir depuis 1942 des lignées pures de Pomme de terre, dont les caractères, tant du feuillage que de l'appareil souterrain, soient fixés. Dans cette sélection, à chaque génération, nous nous référons au type botanique de la variété originelle, et nous cherchons à nous rapprocher de ce type ou à l'améliorer. Donc, à chaque génération, nous choisissons dans la population obtenue par semis des individus se rapprochant du type originel et les graines, provenant des baies récoltées sur ces individus, donnent par semis la génération suivante. Bien que la Pomme de terre soit considérée comme autoféconde, nous avons pratiqué la pollinisation artificielle pour éviter tout apport de pollen étranger.

Cette étude est particulièrement longue, car la production de baies et de graines est fort capricieuse chez la Pomme de terre. Malgré cela, en partant de plusieurs variétés de Pomme de terre, la quatrième génération a été atteinte. La cinquième génération est obtenue à partir des variétés « Deodara » et « Up to date » et les caractères des deux lignées qui en sont issues commencent à se fixer. Enfin, en partant de graines de la variété « Pepo », la septième génération a été cultivée en 1950, et, depuis la cinquième génération, les caractères de cette lignée sont remarquablement fixés. Des plantes issues de semis de graines de cette septième génération et, après repiquage, cultivées en montagne, dans des conditions normales, ont donné jusqu'à 1 kg de tubercules par pied. En partant de la variété « Pepo », nous avons donc obtenu une lignée pure de Pomme de terre, dont le rendement en culture, à partir de graine, continue à être excellent.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. MAGROU. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 1943, 4, 97.
- [2] J. BOUGET. *Ces Annales*, 1943, 69, 287.
- [3] J. MAGROU, J. BOUGET et G. SEGRETAIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1943, 216, 501.

ESSAIS DE LOCALISATION DES PHOSPHATASES DANS LES TISSUS DE *PELARGONIUM ZONALE*

par P. MANIGAULT.

(Institut Pasteur. Service de Mycologie et Physiologie végétale.)

Nous avons poursuivi, depuis plusieurs années, grâce aux conseils et à l'aide de J. Magrou [1], une étude de l'action d'agents physiques sur les tumeurs expérimentales que l'on obtient en inoculant une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* dans l'entre-nœud d'une tige de *Pelargonium zonale*. Pour essayer de mieux comprendre cette action, il nous a paru nécessaire de reprendre, après bien des auteurs, l'étude des réactions histochimiques de la tumeur et des tissus connexes au cours des trois étapes de son développement : latence, précancérisation et cancérisation définitive. Nous avons retenu un fait : c'est l'absence d'amidon dans les tissus tumoraux. Le phénomène est constant et s'observe aussi bien dans les tissus de la tumeur se développant librement que dans ceux d'une tumeur dont la croissance est définitivement arrêtée par l'action d'un champ magnétique. Grâce au concours de J. Blass [2], il a été possible de préciser que les oses libres (ou combinés) sont les mêmes dans les tumeurs et les tissus sains. Nous avons noté, comme d'autres auteurs, que les tissus tumoraux étaient plus riches en azote et en phosphore que les tissus sains. Nous avons pensé alors qu'il y avait intérêt à préciser l'activité et la localisation des phosphatases dans ces tissus. Il nous a été facile de constater, par des dosages sur des broyats de tissus, que l'activité de l'enzyme varie de la base au sommet de la plante, mais qu'elle est beaucoup plus grande au niveau de l'entre-nœud qui porte la tumeur en évolution que dans n'importe quel autre entre-nœud.

En se référant aux travaux de Yin [3], nous avons abordé l'étude sur coupes de la distribution des phosphatases. La méthode de Gomori [4] consiste à rendre visible le phosphate précipité au cours de l'action enzymatique en le transformant en un sel noir grâce à une réaction secondaire (sel d'argent, de cobalt, de plomb). Il est indispensable d'effectuer des réactions identiques sur des coupes servant de témoins, sans substrat, ou après destruction de l'enzyme. La présence de sels de calcium est une cause d'erreur. On pourrait les éliminer comme l'indique Yin [2], à

condition de chercher seulement à situer les phosphatases « acides » à $\text{pH} \leq 6$.

Mais les tannins, qui sont abondants et précoces dans les tissus que nous avons étudiés, adsorbent énergiquement tous ces sels métalliques. Et, comme l'a démontré Michel Durand [5], « la nature colloïdale des tannins et la structure micellaire des éléments des tissus végétaux font que l'adsorption est si énergique qu'aucun des solvants usuels ne permet d'extraire la totalité des tannins ».

Nous avons songé à employer la méthode de Menten, Junge et Green [6]. Le substrat est un naphtol phosphate de calcium. L'enzyme précipite le phosphate et libère le naphtol. On s'efforce de rendre visible ce dernier sur place par l'action d'une amine diazotée qui donne un précipité rouge soluble. M. Bagot, — que nous remercions sincèrement —, a bien voulu nous préparer ces réactifs. Ils sont peu stables, et doivent être préparés peu de temps avant l'emploi. Le naphtol phosphate de calcium est peu soluble. Les composés phénoliques présents dans la coupe rendent la réaction difficile à lire, même en comparant une coupe ayant été au contact du substrat avec une coupe dont on a détruit l'enzyme.

Enfin, nous avons essayé la technique de Bourne [7] mise en valeur par une étude critique de la détection histochimique des enzymes faite par Lison [8]. L'incubation des coupes se fait dans le substrat de Gomori [9] additionné de 0,01 p. 100 d'alizarine sulfonate de soude (rouge d'alizarine S). Le phosphate de calcium libéré donne, avec l'alizarine sulfonate de soude, une laque rouge calcique. Le réactif ne doit pas colorer le fond. On doit toujours effectuer un contrôle en employant une solution sans glycérophosphate. Nous avons essayé, en outre, de situer les tannins sur la coupe avant traitement par des photomicrographies en infrarouge en cherchant à utiliser l'absorption connue des tannins dans cette partie du spectre (Bawden). Il semble bien que les cellules riches en tannins soient aussi des cellules douées d'une phosphatase active. Nous nous proposons de lever cette indétermination par l'emploi du glycérophosphate radioactif. La méthode autoradiographique de Bellanger et Leblong [10] permet de situer sur une couche d'émulsion photographique, qui recouvre la coupe elle-même, la trace du phosphore marqué, alors qu'une coloration *a posteriori* des tissus sous-jacents permet de déceler l'emplacement des tannins.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. MAGROU et P. MANIGAULT. *Rev. Path. vég. Ent. Agr.*, 1948, **27**, 65.
- [2] J. BLASS et P. MANIGAULT. *Ces Annales*, 1950, **79**, 60.
- [3] YIN. *New Phytologist*, 1945, **44**, 191.

- [4] GOMORI. *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, **35**, 802.
- [5] Michel DURAND. *Rev. gén. Bot.*, 1929, **41**, 239.
- [6] MENTEN, JUNGE et GREEN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1944, **57**, 82.
- [7] BOURNE. *Quart. J. exp. Physiol.*, 1944, **32**, 1.
- [8] LISON. *Bull. histol. app.*, 1948, **25**, 23.
- [9] GOMORI. *Am. N. Y. Acad. Sci.*, 1950, **50**, 968.
- [10] BELLANGER et LEBLOND. *Endocrinol.*, 1946, **39**, 8.

SUR LES VARIATIONS SECTORIELLES DES COLONIES DE *TORULOPSIS NEOFORMANS*

par E. DROUHET et M^{lle} M. COUTEAU.

(Institut Pasteur. Service de Mycologie et Physiologie végétale.)

L'étude de Legroux et Magrou, en 1920 [4], sur « l'état organisé des colonies bactériennes » marque le point de départ de nombreuses recherches sur les variations des microorganismes. Ces auteurs étudient l'organisation structurale des colonies microbiennes par la technique des coupes histologiques en série, pratiquées transversalement, après fixation. Cette méthode peut servir à l'étude des variations en secteur des colonies géantes de *Torulopsis neoformans*, levure anascosporée pathogène.

A partir de colonies légèrement bombées, blanches, puis jaunâtres, de consistance crémeuse, correspondant au type *smooth*, et par repiquages successifs sur le milieu maltosé de Sabouraud, on obtient sur des colonies géantes des secteurs du type *muqueur*, transparents, de consistance visqueuse. A côté de ces formes en secteur, peuvent apparaître des îlots elliptiques dont les grands axes sont orientés suivant les rayons de la colonie. A partir de ces secteurs muqueux, sur le même milieu, on obtient des colonies M pures qui, après repiquages successifs, ont à leur tour présenté des variations sectorielles du type S. Ce type S est beaucoup plus stable que le type M. Exceptionnellement, la colonie S sur le milieu glucosé de Sabouraud peut se plisser en son centre, prenant l'aspect du type R. L'examen microscopique de suspensions de levures dans de l'encre de Chine montre pour le type S des cellules de 4 à 6 μ de diamètre entourées d'une très mince capsule, ne dépassant pas 1 μ d'épaisseur ; pour le type M, la capsule est énorme, pouvant atteindre 10 μ d'épaisseur ; le type R est caractérisé par l'absence totale de capsules, et par une tendance à la filamentation (fausse filamentation).

En fonction de divers sucres utilisés comme source carbonée, la consistance crémeuse du type S présente peu de modifications, tandis que la consistance visqueuse du type M change beaucoup, allant de celle de colonies gommeuses à énorme capsule (sur maltose) à celle de colonies coulantes moins capsulées, sur glucose. Dans l'ordre suivant, les sucres produisent des colonies moins

visqueuses et des capsules moins épaisses : maltose, galactose, arabinose, raffinose, saccharose, lévulose, xylose, mannose et glucose. La substance capsulaire, qui influence tant la morphologie des colonies, est constituée de xylose, de mannose et d'un acide uronique [2].

L'organisation structurale des colonies mixtes a été étudiée sur coupes en série, pratiquées transversalement. Avant la fixation, afin d'éviter le décollement des levures, les colonies ont été couvertes d'une couche de gélose ; diverses méthodes de coloration et réactions cytochimiques ont été utilisées pour mettre en évidence sur coupe la capsule, la membrane cellulaire, le cytoplasme et le noyau, ainsi que les structures polyosidiques. Les secteurs S sont formés d'amas de petites cellules très peu capsulées, tassées les unes contre les autres, ce qui explique l'aspect macroscopique opaque et la consistance crémeuse de la colonie S. Les secteurs M sont formés de cellules espacées, entourées de la substance capsulaire, d'où la transparence et la viscosité qui caractérisent macroscopiquement ces secteurs. Les cellules du type S ont une remarquable affinité tinctoriale et leur cytoplasme est intensément coloré par le Gram et le Giemsa, ce qui masque la présence du noyau ; les cellules du type M sont moins fortement colorables par les mêmes colorants. Dans le type M, on note en plus l'apparition de grosses cellules de 8 μ de diamètre, dont le nombre augmente considérablement avec l'âge des colonies. Par la réaction de Feulgen, ces grandes cellules présentent dans un cytoplasme rose un corps légèrement coloré en violet, donc de nature probablement nucléaire. Le colorant de contraste, le vert lumière colore fortement les cellules des secteurs S.

Il nous semble intéressant de rapprocher ces résultats préliminaires des observations de Duguid [3] et de Bunting, Robinow et Bunting [4] sur les rapports entre l'élaboration du matériel capsulaire et la mise en évidence des corps nucléaires chez les bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. LEGROUX et J. MAGROU. *Ces Annales*, 1920, **34**, 417.
- [2] E. DROUHET, G. SEGRETAINE et J.-P. AUBERT. *Ces Annales*, 1950, **79**, 891.
- [3] J. P. DUGUID. *J. Path. & Bact.*, 1948, **60**, 265.
- [4] M. I. BUNTING, C. F. ROBINOW et H. BUNTING. *J. Bact.*, 1949, **58**, 114.

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'INHIBITION
DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC
PAR DIVERSES SUBSTANCES TANNIQUES.
MODE D'ACTION DE CES DERNIÈRES (*)**

par L. HIRTH.

(Institut Pasteur. Service de Mycologie et Physiologie végétale.)

De nombreux auteurs se sont préoccupés de la toxicité d'extraits végétaux divers vis-à-vis des bactéries [1], des plantes elles-mêmes [2], ou des virus végétaux. Nous-même [3] avons étudié l'action d'extraits divers de *Pelargonium zonale* sains et tumoraux sur la croissance de la carotte cultivée *in vitro* et nous avons cherché à établir les causes de la toxicité de tels extraits. Nous nous sommes demandé si l'étude de l'action éventuelle de ces extraits sur le virus de la Mosaïque du Tabac ne pourrait nous apporter de précieux renseignements. Dès 1925, Duggar et Armstrong [4] montraient que l'activité du virus de la Mosaïque du Tabac était inhibée par des extraits de *Phytolacca decandra*. Depuis lors, les études se multiplièrent dans cette direction et de nombreux auteurs montrèrent alors que les extraits végétaux les plus divers pouvaient être inhibiteurs dans des conditions d'ailleurs très variées [5, 6, 7], etc. Récemment Manil entreprit une série d'études systématiques sur l'activité des extraits aqueux d'un grand nombre de plantes [8, 9] appartenant aux groupes végétaux les plus divers ; Takahashi [10], B. Kassanis, Kleczkowski [11] parvinrent même à isoler, purifier et identifier la ou les substances inhibitrices étudiées.

C'est en nous inspirant de ces méthodes et de ces résultats que nous avons entrepris nos travaux sur les extraits aqueux de *Pelargonium zonale*, et ceci afin de préciser les recherches précédemment entreprises [3].

(*) Ces travaux ont été réalisés dans le laboratoire de M. le Dr J. Magrou qui a bien voulu nous accueillir et auquel nous exprimons toute notre reconnaissance.

I. — ETUDE DE L'ACTION D'EXTRAITS DE *P. zonale* SUR LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC. MATÉRIEL ET MÉTHODE.

a) Les extraits de *Pelargonium zonale* comprennent des extraits de tiges saines, des extraits de tumeurs (crown-gall), des extraits distillés de tiges saines et de tumeurs. Ils ont été faits suivant la technique générale indiquée dans notre précédent mémoire [3]. Après ajustage des pH des divers extraits à 4,9-5,0, leur teneur en acide géraniatannique a été évaluée en employant la technique que nous avons mise au point [12] en collaboration avec B. Rybak.

b) Le virus de la Mosaïque du Tabac que nous avons utilisé provenait d'une souche de l'Institut Pasteur et était utilisé sous forme de jus extraits de tabacs inoculés depuis quinze à vingt jours environ. Dans cette première série d'essais, nous avons employé des jus bruts et des jus purifiés (1).

c) L'activité du virus a été mesurée à l'aide du test des lésions locales obtenues sur *Nicotiana glutinosa* (2).

RÉSULTATS.

Dans la première série de résultats que nous indiquons ci-dessous, nous avons utilisé un jus de tabac non purifié.

(1) 15 g de feuilles fraîches de Tabac mosaïqué étaient broyées au mortier. Le jus récolté était centrifugé durant quinze minutes à 6 000 t/m. Les jus utilisés bruts étaient employés tels quels.

Pour la purification, nous avons employé la méthode suivante qui nous a été aimablement indiquée par G. Segretain. Le jus préalablement centrifugé est additionné d'un volume de phosphate disodique à 15 g/litre. On laisse reposer une demi-heure, on centrifuge longuement à 6 000 t/m. Le surnageant est récupéré et on lui ajoute 1/3 de volume de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ saturé ; il se forme un fin précipité blanchâtre. On centrifuge à fond ; le surnageant est éliminé et le précipité est dissous dans 6 cm³ d'eau bidistillée, puis on ajoute 2 cm³ de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ saturé ; on centrifuge de nouveau et on redissout le précipité de la même façon que précédemment. Ces opérations sont recommencées jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Quand ce résultat est obtenu, le précipité est repris par 15 cm³ d'eau bidistillée et mis à dialyser pendant vingt-quatre heures contre de l'eau bidistillée.

(2) Voici le détail d'une mesure effectuée : 1 cm³ de jus de Tabac mosaïqué est additionné de 1 cm³ de chacun des extraits à étudier. Le témoin est obtenu en ajoutant 1 cm³ d'eau bidistillée à 1 cm³ de jus de Tabac. Les pH sont ajustés à 5. Le contact est maintenu pendant quinze minutes à la température du laboratoire. Les feuilles de *N. glutinosa* sont inoculées : la moitié droite avec le virus témoin, la moitié gauche avec l'essai. Plusieurs plantes sont inoculées pour un même essai et les feuilles sont choisies de telle façon que les extraits à tester occupent toutes les positions en tenant compte de la disposition des feuilles sur *N. glutinosa*.

NATURE DE L'EXTRAIT	NOMBRE DE LÉSIONS par demi-feuille (1)	
	Témoins	Virus + extraits
Pz 0 non distillé (2)	45	20
Pz 0 distillé	45	34
Pz t non distillé	44	46
Pz t distillé	48	47

(1) Les chiffres donnés sont des moyennes de trois mesures; il en est de même pour tous les autres tableaux.

(2) La notation suivante a été employée au cours de cet exposé : Pz 0, *Pelargonium zonale* sain; Pz t, tumeur de *Pelargonium zonale* (Crown-gall).

Les extraits employés dans ce premier essai présentaient une nette réaction aux sels de fer et l'évaluation de la teneur en acide géraniatannique nous a donné les résultats suivants : Pz 0, 0,027 p. 100 ; Pz t, 0,036 p. 100.

Après distillation au demi du volume, les extraits sont ramenés à leur volume initial par de l'eau bidistillée.

La deuxième série d'essai, exécutée avec du virus purifié, a donné les résultats suivants :

NATURE DE L'EXTRAIT	NOMBRE DE LÉSIONS par demi-feuille	
	Témoins	Virus + extraits
Pz 0 non distillé	47	16
Pz 0 distillé	31	23
Pz t non distillé	37	38
Pz t distillé	28	27

Les extraits employés contenaient respectivement : PzO, 0,038 p. 100 ; Pz t, 0,041 p. 100 d'acide géraniatannique.

Il ressort des chiffres précédents que l'extrait de *Pelargonium* sain non distillé présente une toxicité nette vis-à-vis du virus et, en tout cas, parfaitement constante au cours des essais que nous avons effectués. Le *Pelargonium* sain distillé semble présenter une toxicité très sensiblement moins forte que celle de l'extrait non distillé. Quant aux extraits tumoraux, ils semblent dépourvus d'activité. Ce résultat est assez facilement interprétable ; l'extrait non distillé de Pz 0 contient des essences dont la toxicité s'avère ainsi manifeste. Les 3 autres extraits n'en contiennent pas. Mais il ne faut pas oublier que tous nos extraits contiennent également des tannins et que l'action toxique de ceux-ci est connue depuis longtemps [13, 14] ; aussi avons-nous cherché à établir le degré de toxicité de ceux-ci et leur responsabilité éventuelle dans l'inhibition du virus par nos extraits végétaux.

II. — INHIBITION DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC PAR LES TANNINS.

A. COMPARAISON DE LA TOXICITÉ DE L'ACIDE TANNIQUE ET DE L'ACIDE GÉRANIATANNIQUE. — Nous avons alors entrepris de comparer l'activité de l'acide tannique pur à l'éther du commerce avec l'acide géraniatannique que nous avons extrait et purifié nous-même (3). La purification de l'acide géraniatannique que nous avons effectuée ne nous permet pas d'affirmer que notre produit est absolument pur. Freudenberg [15] indique, en effet, que chaque tannin doit être purifié par des méthodes qui lui sont particulières. L'acide géraniatannique n'ayant pas fait l'objet, à notre connaissance, d'étude systématique, nous avons employé une méthode voisine de celle qui sert à préparer l'acide tannique du commerce. Le corps obtenu dans ces conditions a l'aspect de paillettes brun rouge. Il est facilement soluble dans l'eau (surtout à chaud), sa solubilité est même plus grande que celle de l'acide tannique. Le pH d'une solution d'acide tannique à 1 p. 100 est de 3,8 ; celui d'une solution d'acide géraniatannique à 1 p. 100 de 3,3.

Dans tous nos essais, les pH des diverses solutions tanniques ont été ramenés à 5.

Les résultats de nos mesures sont résumés par les chiffres suivants ; ils ont été effectués avec du virus purifié.

NOMBRE DE LÉSIONS PAR DEMI-FEUILLE		
Témoins		Virus + solution tannique
Concentration en acide tannique.	1 p. 100 . . .	56
	0,5 p. 100 . .	51
	0,25 p. 100 .	55
	0,1 p. 100 . .	77
	0,05 p. 100 .	83
	0,025 p. 100 .	65
	0,01 p. 100 .	67
Concentration en acide géraniatannique.	1 p. 100 . . .	30
	0,5 p. 100 . .	46
	0,25 p. 100 .	31

(3) Nous avons employé la méthode indiquée dans un précédent mémoire [12] en y apportant quelques modifications. Les poudres ont toujours été laissées vingt-quatre heures au contact du mélange extracteur ; l'extraction n'a pas eu lieu à chaud, afin d'éviter l'oxydation des tannins. Toutes les distillations ont été opérées dans le vide à 26°. Le produit séché est redissous dans un mélange acétone-eau (H₂O 30 p. 100) filtré, évaporé dans le vide, puis repris par l'eau bouillante, filtré et évaporé de nouveau dans le vide. Les produits ainsi obtenus ne contiennent pas d'azote.

Il ressort de ce tableau que :

1° Aux fortes concentrations, l'acide tannique et l'acide géraniatannique semblent avoir une toxicité comparable.

2° Aux concentrations plus faibles, l'acide tannique se montre plus toxique que l'acide géraniatannique, qui se montre inactif à la concentration de 0,25 p. 100, alors que l'acide tannique cesse toute action nocive à la concentration de 0,05 p. 100.

3° Nous voyons également que les concentrations de nos extraits en acide géraniatannique sont très sensiblement inférieures aux pourcentages toxiques de ce même acide. Il semble donc vraisemblable que la toxicité de PzO non distillé soit due surtout aux essences. Quant à la toxicité, légère d'ailleurs, de PzO distillé, elle pourrait être due à une substance, du reste inconnue, dont nous avons laissé prévoir l'existence dans nos travaux précédents, quoiqu'elle se manifeste avec sensiblement moins de netteté dans le cas présent que vis-à-vis des cultures de carotte.

Ces résultats nous ayant permis de constater à la fois la toxicité des tannins et aussi le fait que cette toxicité ne semblait pas égale pour tous, nous nous sommes demandé à quelles causes pourrait être imputée cette toxicité.

B. ETUDE COMPARATIVE DE LA TOXICITÉ DE L'ACIDE TANNIQUE ET DE L'ACIDE GALLIQUE. — L'acide tannique à l'éther et l'acide géraniatannique appartiennent à la catégorie des tannins galliques (ils donnent une coloration bleue avec les sels de Fer) ; ils donnent, en effet, à l'hydrolyse de l'acide gallique et des hexoses. Nous avons songé alors que la toxicité des composés tanniques étudiés était peut-être due à l'acide gallique. Nous avons donc entrepris de comparer l'inhibition du virus de la Mosaïque du Tabac provoquée, d'une part, par l'acide tannique et, d'autre part, par l'acide gallique. Les essais ont été effectués à pH 5 dans les conditions habituelles avec du virus non purifié (4).

Les chiffres ci-dessous résument les résultats obtenus :

NOMBRE DE LÉSIONS PAR DEMI-FEUILLE			
		Témoins	Virus + solution étudiée
Concentration en acide tannique.	{ 2 p. 100.	204	9
	{ 1 p. 100.	163	65
Concentration en acide gallique.	{ 2 p. 100.	190	188
	{ 1 p. 100.	158	151

De l'examen de ces chiffres, deux choses ressortent avec netteté :

1° L'acide gallique n'est pas toxique, ce qui d'ailleurs n'est

(4) Le pH de la solution tannique à 2 p. 100 est de 3,3 et celui de l'acide gallique à 2 p. 100 est de 3,5.

pas surprenant ; en effet, l'acide gallique est connu comme pouvant être un aliment pour les végétaux et, d'autre part, les travaux de True et Hunkel [16] et ceux de Chrysostom [17] tendaient à démontrer que l'acide gallique n'était pas toxique pour les racines de *Lupinus albus*.

2° La comparaison des résultats obtenus fait ressortir qu'en apparence, l'acide tannique est moins toxique dans la deuxième série d'expériences que dans la première. Ce résultat nous a permis de faire une remarque : la contradiction n'est qu'apparente : elle signifie seulement qu'il n'est pas indifférent, quand on étudie l'action inhibitrice d'extraits végétaux ou de substances définies, d'employer un virus purifié ou non. En effet, comme chacun sait, les tannins et les alcaloïdes forment des complexes insolubles ; quand effectivement on estime à l'œil l'intensité du précipité qui se forme au moment de l'adjonction du tannin au jus contenant le virus, on voit qu'il est beaucoup plus intense avec le jus brut qu'avec le jus purifié : une partie appréciable du tannin se combine avec la nicotine et est ainsi soustraite au milieu. Il n'est donc nullement indifférent, comme on le fait trop souvent en étudiant les extraits végétaux, d'employer du jus purifié ou non de Tabac virosé : l'effet inhibiteur d'un extrait peut être masqué par une combinaison préférentielle de l'élément toxique avec certaines substances des jus de Tabac.

Intéressé par ces résultats, nous nous sommes alors demandé s'il ne serait pas possible d'établir un rapport entre la toxicité des tannins et leur constitution chimique.

C. ETUDE DU POUVOIR INHIBITEUR DE QUELQUES TANNINS GALLIQUES ET PYROCATÉCHIQUES. — D'après Meunier et Jamet [18], on peut classer les tannins en tannins galliques faiblement polymérisés et en tannins pyrogalliques fortement polymérisés ; nous nous sommes alors attaché à comparer entre eux ces deux groupes de tannins.

Ayant déjà étudié l'acide géraniatannique, nous nous sommes adressé aux tannins du Thé comme nouvelle substance gallique et à ceux de l'Aubépine et du Marronnier d'Inde comme tannins pyrocatechiques. Tous trois ont été extraits et purifiés par le procédé indiqué plus haut. Le tannin du Thé a un aspect semblable à celui de l'acide géraniatannique ; quant aux tannins pyrocatechiques, ils se présentent sous une forme pulvérulente, légère, et de couleur grise ou brune.

Le tannin du Thé donne à chaud des solutions brunes, limpides, mais par refroidissement, il se forme un précipité extrêmement abondant dont une bonne partie adhère fortement au récipient qui contient la solution ; le tannin du Thé est donc peu soluble à froid. Une solution à 1 p. 100 de ce tannin a un pH de 4.

Les tannins du Marronnier et de l'Aubépine apparaissent comme relativement solubles. A chaud, les solutions sont limpides, à froid, il se forme un léger trouble comparable pour les deux substances envisagées et beaucoup moins intense que pour le Thé. Le pH de la solution de tannin du Marronnier à 1 p. 100 est de 4,7 ; celle de l'Aubépine est de 4,5.

Nous avons alors étudié la toxicité de ces trois nouveaux tannins par le procédé habituel avec des solutions ramenées à pH 5 et en présence de virus purifié. Les chiffres ci-dessous résument les résultats obtenus :

	NOMBRE DE LÉSIONS PAR DEMI-FEUILLE	
	Témoins	Virus + solution tannique
Tannin du Thé à 1 p. 100	54	30
Tannin du Thé à 0,5 p. 100. . . .	65	36
Tannin du Marronnier à 1 p. 100. .	65	45
Tannin du Marronnier à 0,5 p. 100. .	70	60
Tannin de l'Aubépine à 1 p. 100 . .	70	45
Tannin de l'Aubépine à 0,5 p. 100. .	74	60
Acide tannique à 1 p. 100	67	1
Acide tannique à 0,5 p. 100	42	5

De l'étude des chiffres précédents, nous tirons les conclusions suivantes :

a) L'acide tannique est beaucoup plus toxique que les autres tannins étudiés ;

b) Par comparaison, l'acide géraniatannique, quoique moins toxique que l'acide tannique, l'est plus que ceux du Marronnier, de l'Aubépine et du Thé ;

c) Les tannins du Thé, du Marronnier et de l'Aubépine présentent des toxicités à peu près semblables et relativement assez faibles, quoique nettes. Il est à remarquer d'ailleurs que le tannin du Thé présente une toxicité à peu près égale aux concentrations de 1 p. 100 et de 0,5 p. 100. Ceci peut s'expliquer par la faible solubilité du tannin du Thé à froid. Il est alors à cette concentration de 0,5 p. 100 plus toxique que les tannins pyrocatechiques.

En résumé, compte tenu de la faible solubilité du tannin du Thé, et pour les substances que nous avons étudiées, les tannins pyrocatechiques nous apparaissent comme moins toxiques que les tannins galliques. Ceci est d'ailleurs en accord avec d'autres observations : c'est ainsi que si l'on éprouve des difficultés ou des impossibilités à cultiver *in vitro* les tissus de Chêne ou de *Pelargonium* [19, 3], et si les tannins de ces deux végétaux se montrent toxiques, les observations de Morel [20] ont montré que les tannins de l'Aubépine n'entraient en rien la croissance des tissus de cette plante cultivée *in vitro*.

L'étude de ce phénomène général, quoique varié dans ses manifestations, qu'est l'inhibition du virus de la Mosaïque du Tabac par les tannins, nous a conduit à nous demander quel pouvait être le mécanisme d'action de ces derniers.

III. — ETUDE DES CAUSES DE L'ACTION INHIBITRICE EXERCÉE PAR LES TANNINS SUR LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC.

L'on sait que l'action toxique des tannins a été souvent interprétée comme le résultat soit de leur action anti-oxygène, soit de leurs propriétés tannantes. Beaucoup de tannins forment, en effet, des complexes imputrescibles avec les protéines. Or, il est difficile d'admettre que les propriétés anti-oxygène des tannins puissent être rendues responsables de l'inhibition du virus de la Mosaïque du Tabac. Il est plus vraisemblable de penser qu'il s'agit d'une association complexe entre le tannin et cette nucléoprotéine anormale qu'est le virus de la Mosaïque du Tabac. Nous sommes alors parti de l'idée que l'inhibition du virus était due à la combinaison entre ces substances acides que sont les tannins et la protéine spécifique présente dans le virus : la partie nucléique du virus ne serait pas affectée par la présence du tannin. Pour étayer cette hypothèse, nous avons donc entrepris les expériences suivantes :

a) Une solution d'acide tannique à 1 p. 100 est additionnée volume à volume d'une solution d'acide ribonucléique de levure purifié. Nous avons fait varier les pH entre 2 et 9, et nous n'avons jamais obtenu de précipité ; au fur et à mesure que le pH s'élève, la coloration de la solution passe de jaune clair au rouge orangé et au brun, colorations que l'on obtient en élevant le pH d'une simple solution d'acide tannique. Tout porte donc à croire qu'aucune combinaison, ou tout au moins qu'aucun complexe insoluble ne se forme entre acide nucléique et tannin.

b) Par contre, si nous faisons les mêmes expériences avec une solution de sérumalbumine de cheval purifiée à la concentration de 1 p. 100, nous constatons la formation d'un abondant précipité en présence d'acide tannique à 1 p. 100 : ce précipité est particulièrement net à pH 4,2. Le liquide est alors d'un blanc crémeux très caractéristique. Si l'on élève le pH de la solution par adjonction de soude N/5, nous voyons qu'à pH 7,4 la solution n'est plus que très légèrement trouble et qu'elle a pris une coloration tirant sur le violet analogue à celle des solutions d'acide tannique pur à ce pH. A pH 8,2, toute trace de précipité a disparu et la coloration s'est encore accentuée. A pH 9,8 la solution, toujours parfaitement limpide, tire sur le brun foncé. Nous avons ainsi confirmé les vues de Danielsson [21] qui estimait qu'aux pH

élevés (9,4), la solution tannin-protéine contenait les deux constituants libres et conservant chacun leur propriétés particulières. Nous avons alors pensé que si les tannins agissaient en formant un complexe, uniquement avec la protéine du virus, la valeur du pH devait avoir une action fondamentale sur l'inhibition du virus : aux pH bas, l'inhibition devait être plus complète qu'aux pH élevés, où, si nos vues étaient justifiées, le virus devait récupérer sa virulence.

Certes, le problème se complique du fait que les diverses souches du virus de la Mosaïque ne supportent pas avec autant d'aisance les unes que les autres les élévations de pH. C'est ainsi que pour Best [22] la majeure partie du virus de la mosaïque est inhibée entre pH 8 et 8,9. Bawden et Pirie [23] trouvèrent qu'une inhibition très sensible ne se manifestait guère qu'à pH 10,5 ; ils trouvèrent même à pH 9,3 une curieuse exaltation de la virulence.

Tenant compte de tous ces faits, nous avons conçu une expérience qui constitue le point de départ d'un travail actuellement en cours et destiné à préciser, si possible, dans ses détails le mode d'action des tannins sur les virus.

Quatre solutions ont été ainsi préparées :

1 cm³ d'une solution d'acide tannique à 1 p. 100 est additionné de 1 cm³ de virus purifié comme il a été indiqué, puis les pH sont ajustés respectivement à 4,9, 7, 7,9, 8,9 (5).

Deux lots de *Nicotiana glutinosa* ont été inoculés, le premier comportant, sur la partie gauche des feuilles, les solutions aux divers pH, la partie droite étant frictionnée avec le jus provenant de l'addition de 1 cm³ d'eau bidistillée à 1 cm³ de virus purifié (pH 6,4) : le deuxième lot a eu comme témoin, sur la partie droite des feuilles, la solution à pH 4,9 (qui, comme nous l'avons vu, devait avoir perdu sa virulence), la partie gauche a été inoculée avec les solutions aux trois autres pH. Les chiffres suivants résument les résultats obtenus.

NOMBRE DE LÉSIONS PAR DEMI-FEUILLE		
	Témoins (Virus pur. + 1 cm ³ H ₂ O)	Virus + sol. tannique
	—	—
pH auxquels sont ajustées les solutions.	4,9	27
	7,0	28
	7,9	28
	8,9	30
		0
		2
		10
		6

(5) La solution à pH 4,9 était légèrement trouble et à peine colorée. Les trois autres solutions sont limpides et ont les colorations caractéristiques des solutions tanniques aux pH correspondants.

NOMBRE DE LÉSIONS PAR DEMI-FEUILLE

Témoins (Virus + sol. tannique : Virus + sol. tannique pH 4,9)			
		—	—
pH auxquels	{ 7,0	0	5
sont ajustées	{ 7,9	1	5
les solutions.	{ 8,9	1	8

Les résultats de ces premiers essais ne peuvent donner lieu à des affirmations d'une netteté absolue ; cependant, il semble ressortir que, d'une façon générale, l'acide tannique en présence de virus à pH 4,9 est sensiblement plus toxique que lorsqu'il est employé à des pH plus élevés, ce qui tend à confirmer nos vues ; il apparaît également deux choses :

a) Une tendance qui aura besoin d'être confirmée : l'activité du virus croît avec le pH de la solution tannin-virus. Cette croissance est d'ailleurs assez légère ; elle apparaît cependant comme nette, surtout dans le 1^{er} essai.

b) Le virus ne récupère pas, et d'assez loin, son activité totale. Ce phénomène peut d'ailleurs s'expliquer et fera l'objet de précisions ultérieures. A pH 7, les travaux déjà signalés de Best et de Bawden [22, 23] tendent à faire penser que la virulence devrait être égale à celle du témoin, mais à ce pH la dissociation du complexe virus-tannin n'est pas complète et il subsiste donc certainement une inhibition due à l'acide tannique. Aux pH plus élevés, la disparition de l'action du tannin est compensée par l'action des ions OH⁻. Nous sommes donc en présence de deux actions qui interfèrent en sens opposé et qu'il sera bon de dissocier.

DISCUSSION.

De l'ensemble de ce travail, il ressort :

1° Que l'action inhibitrice qu'exercent les extraits végétaux peut être due aux causes les plus variées, que les essences, les tannins, les substances protéiques, etc., interviennent et qu'en conséquence les modes d'action de ces substances sont fort différents les uns des autres. Il convient donc, dans une étude systématique de multiples extraits végétaux, de s'attacher à connaître autant que possible les éléments constitutifs importants de l'extrait. Il est même possible, sinon probable, que l'action de certaines substances (comme les tannins) puisse masquer l'activité d'autres substances présentes dans les extraits et dont l'action passe alors inaperçue.

2° L'étude de l'inhibition du virus de la Mosaïque du Tabac par divers tannins nous a montré que l'action toxique de ceux-ci

n'était pas, dans le cas présent, due à une action anti-oxygène, mais à la formation d'un complexe tannin-nucléoprotéine. Il est intéressant, d'ailleurs, de remarquer que Lutz [14] signale également la puissante action anti-oxygène de l'acide gallique ; or, celui-ci s'est montré parfaitement inactif sur le virus de la Mosaïque. Sans vouloir minimiser l'importance des propriétés anti-oxygène des tannins, il est permis de penser que ceux-ci ont d'autres modes d'action ; il est d'ailleurs bon de rappeler que ceux qui se sont montrés peu toxiques pour le virus, le sont également peu pour les tissus végétaux cultivés *in vitro*. Cette dernière remarque nous incite à penser que la mesure du degré d'inhibition du virus de la Mosaïque par les tannins peut représenter une méthode commode, simple et relativement précise d'évaluation de la nocivité de ces derniers. D'autre part, elle représente le point de départ d'une recherche des raisons des différences de toxicité observées pour les divers tannins étudiés. Dans cet ordre d'idées, nous avons déjà montré que la présence d'acide gallique dans la molécule d'acide tannique n'était pas responsable de la toxicité de ce dernier ; il est évident que la structure moléculaire du tannin doit intervenir dans son pouvoir toxique : peut-être notre méthode d'étude nous permettra-t-elle d'apporter une contribution à l'étude de la structure des divers tannins et à éclaircir les relations existant entre cette structure et leur toxicité.

3° La dernière partie de ce mémoire nous semble pouvoir constituer une hypothèse de travail. Markham [24], grâce à une élégante expérience, paraît avoir voulu démontrer que c'était surtout la fraction nucléinique du virus qui était responsable de sa nocivité. Les résultats que nous avons obtenus tendent à démontrer que si un complexe est formé avec la partie protéinique du virus, la virulence de celui-ci disparaît, ou est partiellement inhibée ; de plus, si ce complexe est dissocié, le virus semble pouvoir récupérer au moins en partie son activité. Des travaux ultérieurs préciseront ce dernier point. Ceci pourrait nous conduire à penser que la partie protéinique du virus est peut-être responsable de la virulence, surtout si nous nous rappelons que Knight [25] a montré que les souches de virus de la Mosaïque du Tabac ayant des virulences différentes, présentaient aussi des différences sensibles dans leur composition en acides aminés. Il faut cependant être très prudent, car la formation d'un complexe insoluble tannin-nucléoprotéine peut faire perdre à la molécule de virus ses propriétés infectantes bien que la fraction nucléinique n'entre pas, à proprement parler, dans la formation du complexe. Il est également possible que les deux fractions de la molécule de virus soient toutes deux indispensables à l'activité de l'agent pathogène.

RÉSUMÉ.

1° L'action inhibitrice des extraits de *Pelargonium zonale* sains et tumoraux a été étudiée. Les essences sont actives sur le virus de la Mosaïque du Tabac, les tannins contenus dans les extraits tels que nous les avons faits ne le sont pas.

2° L'action de divers tannins sur le même virus a été envisagée (acide tannique, acide géraniatannique, tannins du Thé, du Maronnier, de l'Aubépine) : les tannins galliques sont nettement plus toxiques que les tannins pyrocatechiques.

3° Le complexe tannin-virus est dû à une combinaison avec la partie protéinique du virus : il peut être dissocié à pH 8,2, le virus semble alors récupérer sa nocivité. Le mode d'action des tannins et le rôle de la fraction protéinique du virus dans la virulence sont discutés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. RYBAK. *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 586.
- [2] R. GRAY et J. BONNER. *Am. J. Bot.*, 1948, **35**, 52.
- [3] L. HIRTH et B. RYBAK. *Rev. Gén. de Bot.*, 1949, **56**, 1-11.
- [4] B. M. DUGGAR et J. K. ARMSTRONG. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 1925, n° 12.
- [5] J. JOHNSON et A. HOGGAN. *Phytopathology*, 1937, **27**, 1014.
- [6] J. E. KUNTZ et J. C. WALKER. *Phytopathology*, 1947, **37**, n° 8.
- [7] F. C. BAWDEN et A. KLECZKOWSKI. *J. Pomology*, 1945, **21**, 27.
- [8] P. MANIL. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 101.
- [9] P. MANIL. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 105.
- [10] W. N. TAKAHASHI. *Science*, 1946, **104**, 377.
- [11] B. KASSANIS et A. KLECZKOWSKI. *J. Gén. Microbiol.*, 1948, **2**, 143.
- [12] B. RYBAK et L. HIRTH. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31**, 1092.
- [13] Loo et Loo (1935-1936), cité in White. *Am. Rev. Biochem.*, 1942, **11**, 623.
- [14] L. LUTZ. in *Traité de Cryptogamie*, 1948, 460 et 461.
- [15] FREUDENBERG. *Handb. Biol. Arbeit. Abderhalden's*, 1921, **1**, 10.
- [16] R. H. TRUE et G. C. HUNKEL. *Bot. Centralbl.*, 1898, **76**, 289.
- [17] M. M. CHRYSOSTOM. *Ann. J. Bot.*, 1936, **23**, 461.
- [18] MEUNIER et JAMET. *Chim. Ind.*, 1926, **15**, 499.
- [19] C. JACQUIOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 434.
- [20] G. MOREL. Thèse, *Ann. Epiphyt.*, 1948, **14**, mémoire n° 5.
- [21] C. E. DANIELSSON. *Svensk. Kem. T.*, 1947, **60**, 142.
- [22] R. J. BEST. *Austr. J. exp. Bio. Med. Sci.*, 1936, **14**, 323.
- [23] F. C. BAWDEN et M. V. PRIE. *Plant viruses and virus diseases*, Waltham, 1943.
- [24] R. MARKHAM, R. E. E. MATHEWS et K. H. SMITH. *Nature*, 1948, **162**, 88.
- [25] C. A. KNIGHT. *Exp. Cell. Res.*, 1949 (suppl. 1), 168.

RECHERCHES, CHEZ LE COBAYE, DE LA TRANSMISSION DES ANTICORPS ET DU VIRUS APHTEUX DE LA MÈRE AU JEUNE (1)

(Institut Pasteur. [Annexe de Garches].)

par E. LEMETAYER, A. GURSEL et M^{me} B. VIRAT(*)

I. — TRANSMISSION DE L'IMMUNITÉ ANTI-APHTEUSE DE LA MÈRE AU JEUNE.

Köbe (1941) constate que les jeunes veaux, nés de mères vaccinées contre la fièvre aphteuse, possèdent une résistance spécifique à l'infection comparable à celle des veaux issus de mères guéries de la maladie. H. Girard, d'après J. Basset, observe un fait analogue ; un veau, né d'une mère vaccinée, éprouvé de diverses manières, témoigne d'une résistance complète à l'infection [4]. Tels sont les seuls renseignements que nous fournit la bibliographie sur la transmission de l'immunité anti-aphteuse de la mère au jeune.

Nos recherches ont porté exclusivement sur le cobaye, seul animal nous permettant de multiplier les essais, afin de préciser si nos connaissances sur la transmission maternelle de l'immunité, en général, peuvent être étendues à la fièvre aphteuse.

PRÉPARATION D'UN VACCIN ANTI-APHTEUX. -- Pour réaliser ces recherches, nous avons d'abord préparé un vaccin anti-aphteux. Nous sommes partis d'aphtes de cobayes, conservés depuis cinq ans dans une solution glycinée tamponnée [virus O] (2). Après un certain nombre de passages sur cobaye, nous avons pu, assez facilement, faire acquérir à notre virus une activité suffisante. A la dose de 0,5 cm³ d'une dilution au 250 000^e au moins, il était

(1) Certaines de ces recherches concernant la première partie de notre mémoire (transmission des anticorps de la mère au jeune) ont été exposées en détail dans une thèse de l'un de nous, A. Gursel. Recherches expérimentales sur la transmission de l'immunité anti-aphteuse de la mère au jeune. *Thèse de Doctorat Vétérinaire*. Paris 1950.

(*) Nous remercions M^{lle} M. M. Gdaniek, aide-technique, de son dévoué concours technique à l'occasion de ces diverses recherches.

(2) Virus qui nous avait été aimablement fourni en 1942 par notre regretté collègue et ami, M. Rinjard, directeur du Laboratoire de Recherches vétérinaires du ministère de l'Agriculture.

capable, inoculé dans le derme plantaire du cobaye, de donner une localisation en moins de vingt-quatre heures et une généralisation en quarante-huit heures (3).

Pour préparer notre vaccin, nous inoculons 50 cobayes par piqûres intradermiques (4), une soixantaine, effectuées au niveau de la face plantaire de la région tarso-métatarso-phalangienne. Vingt-quatre heures après, les aphtes sont prélevés ; nous obtenons ainsi 9,5 g d'aphtes, soit 0,19 g par sujet. Ces aphtes sont hachés finement, broyés au mortier avec de la poudre de quartz, mis en suspension dans 45 cm³ de solution tampon à pH 7,6 ; le tout est ensuite centrifugé à grande vitesse (6 000 tours), durant trente minutes. Le liquide surnageant est recueilli, puis filtré sur bougie L3 ; l'activité du virus avant et après filtration est au moins de 1/500 000.

Au virus filtré, nous ajoutons 0,75 cm³ p. 1 000 de formol, soit 7,5 cm³ p. 1 000 de formol du commerce au dixième. Ce virus filtré et formolé est mis à l'étuve à 26°-27° pendant quarante-huit heures (méthode utilisée déjà par H. Vallée, H. Carré et P. Rinjard en 1925 [2]. Par ce procédé nous obtenons divers lots de vaccins, toujours avirulents lorsque nous les avons utilisés par voie sous-cutanée, donnant parfois, pour certains échantillons, une lésion locale légère et fugace lorsque nous les avons injectés par voie intradermique. Nous aurions pu, en augmentant légèrement la quantité de formol, la durée ou la température de l'étuvage, obtenir la détoxification complète du virus, même si ce dernier était injecté par voie intradermique ; nous ne l'avons pas recherchée, notre vaccin devant être exclusivement utilisé par voie sous-cutanée.

Par quelques essais, nous nous sommes assurés ensuite de l'activité de ce vaccin, soit en éprouvant les sujets vaccinés, soit en titrant le pouvoir neutralisant et le pouvoir préventif du sérum de nos vaccinés [3]. De ces essais, effectués comparativement avec le vaccin du type Vallée-Schmidt-Waldmann, nous avons pu conclure à l'activité excellente et même supérieure de notre vaccin.

A noter que, compte tenu des différences individuelles, l'immunisation réalisée avec une seule injection est au moins égale à celle obtenue, dans les conditions de nos expériences, avec deux

(3) Soulignons le fait qu'un virus aphteux, conservé dans un milieu glycériné tamponné durant cinq années, est resté vivant et que nous avons pu assez facilement, après quelques passages, lui faire reprendre une très forte virulence. Soulignons également que notre virus ne perd rien de sa virulence par la filtration sur bougie L3.

(4) Opérations grandement facilitées par l'emploi d'un porte-aiguilles à quatre pointes que nous avons fait fabriquer par la Maison Gassel-Duranton, Paris.

injections. D'autre part, nos échantillons de vaccin formolé sans alun nous ont donné de meilleurs résultats que les échantillons analogues de vaccin que nous avons alunés. Nous avons déjà fait antérieurement des constatations analogues.

VACCINATION DES FEMELLES EN ÉTAT DE GESTATION. RECHERCHE DE L'IMMUNITÉ DU JEUNE. — En possession d'un vaccin très actif,

TABLEAU I. — Sujets issus de mères ayant reçu une ou deux doses de vaccin durant la gestation.

NUMÉRO du lot du vaccin	NOMBRE de doses	NUMÉRO des jeunes	JOURS (1)	ÂGE DU JEUNE (jours)	OBSERVATIONS DES JEUNES inoculés avec 2 500 D.I. de virus (jours)							
					1 ^{er}	2 ^e	3 ^e	4 ^e	5 ^e	6 ^e	7 ^e	8 ^e
1	1	62.74	4	9	L	L	G	G	+			
	»	62.94	13	7	?	L	0	0	0	0	0	0
	»	62.97	14	5	L	L	0	0	0	0	0	0
	»	62.98	14	12	0	0	0	0	L	L	L	L
	»	62.95	13	18	0	0	L	L	?	?	0	0
	»	62.99	14	35	L	?	0	0	0	0	0	0
2	»	62.91	12	1/2	?	L	L	0	0	0	0	0
	»	62.92	12	15	?	L	0	0	0	0	0	0
	»	62.93	12	38	L	L	0	0	0	0	0	0
4	2	81.81	4	3	0	?	0	0	0	0	0	0
	»	81.82		10	0	0	0	0	0	L	L	?
	»	81.98	6	5	L	L	0	0	0	0	0	0
	»	81.99	6	9	0	0	0	0	0	0	0	0
	»	81.85	13	4	?	L	0	0	0	0	0	0
	»	81.94	13	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	»	81.86	13	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	»	81.87	13	30	0	L	?	0	0	0	0	0
	»	81.95	13	30	?	L	?	0	0	0	0	0
	»	81.90	4	12	L	L	0	0	0	0	0	0
	»	81.91	4	35	0	L	?	0	0	0	0	0
	»	62.79	8	35	0	0	0	0	0	0	0	0
	»	62.86	12	31	0	L	L	0	0	0	0	0
	»	62.80	8	45	L	L	?	0	0	0	0	0
2	»	81.83	2	2	0	0	0	L	L	0	0	0
	»	81.84	2	10	L	0	0	0	0	0	0	0
	»	61.81	7	8	L	L	0	0	0	0	0	0
	»	62.81	10	12	L	?	0	0	0	0	0	0
	»	62.80	13	30	L	L	0	0	0	0	0	0
	»	81.92	4	1/2	L	L	L	L	0	0	0	0
	»	81.89	6	8	L	L	L	0	0	0	0	0
	»	81.93	8	6	L	L	0	0	0	0	0	0
	»	61.82	8	3	L	L	L	0	0	0	0	0

(1) Nombre de jours séparant la vaccination de l'accouchement. G, généralisation; L, localisation; 0, aucune lésion, +, mort.

nous nous sommes d'abord assurés que les femelles cobayes en gestation supportent sans dommage des injections de notre vaccin et se vaccinent dans des conditions aussi satisfaisantes que les autres sujets. Toutes les femelles vaccinées, éprouvées par inoculations intradermiques de 2 500 doses infectantes dix à quinze jours après une ou deux injections de 1 cm³ de notre vaccin, ne présentent ultérieurement rien d'anormal ou tout au plus, pour certains sujets, un aphte local bénin et fugace, alors que tous les témoins font une généralisation en quarante-huit heures.

Des femelles cobayes, en gestation plus ou moins avancée, reçoivent sous la peau, soit une seule dose de 1 cm³ de vaccin, soit deux doses de 1 cm³ à quinze jours d'intervalle, soit du sérum anti-aphteux suivi de une ou deux doses de vaccin. A la naissance, les jeunes sont marqués et éprouvés par la suite, à intervalle variable après cette naissance, par inoculation intradermique de 2 500 doses infectantes; tous ces sujets sont ensuite mis en observation.

Les résultats enregistrés sont rassemblés dans le tableau I.

A noter que dans ces essais, 19 témoins (jeunes sujets d'âge comparable), éprouvés dans les mêmes conditions, ont tous présenté une généralisation en quarante-huit heures.

Dans d'autres essais, effectués pour étudier la transmission de l'immunité des mères séro-vaccinées, deux de nos femelles ainsi traitées ont donné naissance à deux et même trois petits; ceci nous a permis, ainsi que le montre le tableau II, de mieux mettre en évidence l'influence individuelle et nous a donné certaines facilités pour préciser la durée de cette immunité transmise.

TABLEAU II.

NUMÉRO de la mère	SÉRO- VACCINATION	NOMBRE de jours (1)	NUMÉRO des jeunes	ÂGE des jeunes	OBSERVATIONS DES JEUNES (jours)				
					1 ^{er}	2 ^e	3 ^e	4 ^e	5 ^e
1	2 cm ³ sérum + deux inj. de vaccin.	38	83	9	L	L	L	L	L
			81	60	L	L	L	L	L
			86	130	L	L	G	Mort.	
			85	10	L	L	L	L	L
2	<i>Id.</i>	37	94	130	L	G	G	G	G
3	<i>Id.</i>	37	95	10	L	L	G	G	Mort.
4	<i>Id.</i>	41	96	10	L	L	L	L	L
5	<i>Id.</i>	54	97	20	L	L	G	G	Mort.

(1) Nombre de jours séparant la séro-vaccination de la naissance. L, localisation; G, généralisation.

Nous avons également réalisé divers essais afin d'étudier la

transmission de l'immunité passive de la mère au jeune. A des femelles cobayes en gestation, nous injectons 1 cm³ de sérum anti-aphteux ; toutes ces femelles accouchent dans les dix à douze jours suivants. Les jeunes sont alors éprouvés, dans les douze à vingt-quatre premières heures, par inoculation intradermique de 2 500 doses infectantes. A la suite de cette épreuve, ils présentent uniquement un aphte local alors que tous les témoins de même âge, éprouvés dans les mêmes conditions, font une généralisation rapide suivie de mort. Les jeunes, issus de mères sérumisées depuis plus de quinze jours, se comportent comme les témoins (5).

De l'ensemble des résultats de nos divers essais, qui confirment tous ceux que nous avons indiqués dans les tableaux I et II, nous pouvons conclure ainsi :

1° Seul un cobaye (62.74), issu d'une mère vaccinée vingt-quatre heures avant l'accouchement (ne pouvant donc pas être considérée comme effectivement immunisée), ne présente aucune immunité ; il fait, à l'épreuve, une généralisation et meurt le cinquième jour. Tous les autres cobayes, dont les mères avaient reçu une injection de vaccin de six à treize jours avant l'accouchement, ont présenté une résistance très nette à l'épreuve (une lésion locale au plus chez certains sujets, mais sans généralisation). Les jeunes cobayes témoins de même âge (19 sur 19) ont présenté une généralisation en quarante-huit heures avec mort du troisième au septième jour.

Dans d'autres essais, nous avons enregistré la transmission de l'immunité chez des jeunes sujets issus de femelles vaccinées soixante-deux et soixante-neuf jours avant l'accouchement.

Les jeunes issus de mères insuffisamment vaccinées et ayant présenté de ce fait une généralisation à la suite d'une épreuve virulente effectuée au cours de la gestation, présentent toujours une immunité très élevée (absence totale d'aphtes primaires). Cette immunité est très précoce ; nous l'avons enregistrée quelques heures après la naissance.

Chez tous les sujets que nous avons examinés, il y a donc toujours eu transmission de l'immunité (vaccinale ou d'infection) de la mère au jeune et cette immunité du jeune s'est montrée très élevée (6).

(5) Il s'agissait d'un sérum anti-aphteux préparé sur le cheval, donc d'un sérum hétérologue.

(6) Nous nous proposons, dans des recherches ultérieures, de préciser le rôle qui revient dans cette transmission de l'immunité, d'une part à la voie placentaire, d'autre part à la voie mammaire.

A noter que cette transmission de l'immunité de la mère à ses descendants a été signalée dans d'autres maladies à virus, par exemple : dans la rage (Remlinger, Konradi, O. Hermann) [4], dans la clavelée [4], dans l'encéphalomyélite américaine : « Les cobayes nés

2° L'immunité des jeunes cobayes issus de mères ayant reçu deux doses de vaccin n'est pas supérieure à celle des jeunes issus de mères vaccinées au moyen d'une seule dose.

3° Ici également nous avons fait les mêmes constatations que celles que nous avons relevées au sujet de l'immunité des mères vaccinées au moyen de notre vaccin aluné [4]. Les jeunes issus des femelles vaccinées au moyen de ce vaccin aluné ont une immunité moins élevée que celle des jeunes issus de mères vaccinées avec le vaccin simple.

4° L'immunité de ces jeunes est durable et elle est encore très marquée chez nos cobayes âgés de 43 jours et même chez certains âgés de 60 jours ; nous ne l'avons plus retrouvée chez les sujets plus âgés.

5° L'immunité passive des mères est également transmise aux jeunes.

II. — TRANSMISSION PLACENTAIRE DU VIRUS APHTEUX DE LA MÈRE AU JEUNE.

CHEZ LES BOVIDÉS. — L'infection du fœtus est possible dans les derniers jours de la gestation [5].

N'ayant trouvé dans la littérature aucune étude expérimentale sur cette transmission, nous avons poursuivi un ensemble de recherches afin d'étudier ce passage du virus de la mère au fœtus ainsi que la virulence relative des divers tissus de ce dernier.

A 8 femelles cobayes en gestation plus ou moins avancée, nous inoculons, par voie intradermique ou par voie sous-cutanée, des quantités variables (voir tableau III) d'un virus actif au millionième.

A la suite de ces inoculations, toutes les femelles, sauf une, font en quarante-huit heures une généralisation de fièvre aphteuse avec ou sans avortement. Les femelles qui n'ont pas encore avorté sont sacrifiées le deuxième ou le troisième jour. Du sang est prélevé par ponction cardiaque à toutes ces femelles. Après ouverture de la cavité abdominale, les fœtus sont extraits puis lavés abondamment avec de l'eau physiologique ; ils sont ensuite autopsiés et on prélève le poumon, le cœur, le foie, la rate, ainsi qu'un fragment d'intestin. Le poumon et le cœur d'une part, le foie et la rate d'autre part, ainsi que l'intestin, sont broyés au mortier avec de la poudre de quartz ; la virulence de ces divers

de mères immunisées contre les souches est et ouest sont immuns pendant un mois au moins et jusqu'à trois mois après la naissance, alors qu'il n'en est pas de même chez les petits nés de mères immunisées contre la maladie de Borna ou le virus Moscou 2 » [4].

tissus, ainsi que celle du sang de la mère, est recherchée par inoculation intradermique de ces broyats, au niveau du derme plantaire de cobayes (deux cobayes par groupe d'organes). Le protocole de ces recherches, ainsi que les résultats enregistrés sont résumés dans le tableau III.

TABLEAU III.

NUMÉRO DES FEMELLES	JOURS (1)	VIRUS INOCULÉ	OBSERVATION DES FEMELLES	VIRULENCE DU				
				Sang de la mère	Fœtus			
					Poumons + cœur	Foie + rate	Intestin	
Résultats (6)								
1	15	(2)	Généralisation en 48 heures Pas d'avortement. Sacrifiée le 3 ^e jour.	+	+	+	+	
2	30	(3)	<i>Id.</i>	+	0	0	0	
3	20	(2)	<i>Id.</i> Sacrifiée à la 48 ^e heure.	+	0	0	0	
4	30	(4)	Généralisation en 48 heures. Avortement le 2 ^e jour.	+	+	+	0	
5	30	(4)	<i>Id.</i>	+	0	0	0	
6	30	(4)	Pas de généralisation. Avor- tement. Autopsie le 2 ^e jour.	+	0	0	0	
7	A terme.	(5)	Généralisation en 48 heures. Pas d'avortement. Sacrifiée le 2 ^e jour.	+	+	?	+	
8	40	(5)	Généralisation aux 2 ^e -3 ^e jours. Pas d'avortement. Sacrifiée les 2 ^e -3 ^e jours.	+	?	?	0	

(1) Ancienneté approximative de la gestation au moment de l'épreuve virulente.
(2) 1 cm³ de virus au dixième sous la peau.
(3) 0,5 cm³ de virus au centième dans le derme de la face plantaire.
(4) 4 cm³ de virus au dixième sous la peau.
(5) 6 cm³ de virus au dixième sous la peau en deux endroits.
(6) Examens des cobayes inoculés par voie intradermique avec ces divers tissus.
G, généralisation obtenue au moyen de ces divers tissus; 0, ni localisation, ni gé-
néralisation.

Des résultats rassemblés dans le tableau III, nous pouvons conclure :

1° Le sang des cobayes femelles inoculées avec du virus s'est toujours montré virulent, dans les conditions de nos expériences, deux à trois jours après l'injection virulente. Ce sang contient environ 100 doses infectantes au centimètre cube; 6 femelles sur 8 ont avorté.

2° Les viscères des fœtus (avec ou sans avortement) âgés de 15 à 52 jours et examinés quarante-huit heures environ après

l'injection de virus aux mères, contiennent, chez certains fœtus, du virus en quantités variables (7). Les divers viscères semblent à peu près également touchés.

En résumé, la transmission de l'immunité anti-aphteuse de la mère au jeune nous apparaît régie par les mêmes règles que celles de la transmission de l'immunité antitoxique (apparition rapide, taux d'immunité analogue à celui de l'immunité de la mère, caractère passif de cette immunité à durée relativement longue, disparition vers l'âge de 2 à 3 mois [6]).

Par contre, alors que l'antigène toxique ou anatoxique ne passe pas à travers le placenta, de la mère au fœtus, le virus aphteux peut, d'une façon irrégulière certes, traverser le placenta sans entraîner fatalement l'avortement ; il peut être retrouvé dans certains viscères, aucun de ceux-ci ne paraissant être plus fréquemment atteints. Ainsi donc toxine et virus, auxquels certains auteurs trouvent quelques analogies, peuvent être rapprochés de par les caractères de la transmission de la mère au jeune des immunités qu'ils développent chez les mères ; par contre, ils s'éloignent l'un de l'autre par le passage du virus à travers le placenta, celui-ci étant imperméable aux toxines.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BASSET. *Bull. Acad. Vétér.*, 1949, n° 6, 237.
- [2] H. VALLÉE, H. CARRÉ et H. RINJARD. *Rev. Gén. Méd. Vétér.*, 1926, 35, 307.
- [3] Voir G. RAMON, E. LEMÉTAYER, avec la collaboration de E. LASFARGUE, P. MINGUET, L. NICOL, P. RAMON, B. VIRAT, M^{me} J. VIRAT et F. YEU. *Bull. Acad. Vétér.*, 1942, 46, n° 12, 366.
- [4] C. LEVADITI, P. LÉPINE et J. VERGE. *Les ultravirus des maladies animales*. Maloine, Paris, 1948.

(7) Rappelons que C. Levaditi, Nicolau et Galloway établissent chez l'adulte que, lors de la phase d'invasion, le virus est présent dans certains parenchymes : poumon, foie, rate. Toutefois, même lorsque le sang est pleinement virulent, les muscles et certains tissus se révèlent parfois dépourvus de tout pouvoir pathogène. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, 95, 1030.

La transmission du virus de la mère au fœtus à travers le placenta a été signalée et étudiée dans d'autres maladies à virus, par exemple : dans la clavelée, dans la maladie de Borna, dans le typhus, dans la rage (C. Levaditi, P. Lépine et J. Verge. *Les ultravirus des maladies animales*. Masson, 1948) ; un ultravirus est responsable de certains avortements infectieux chez les équidés (J. Verge et C. Cauchy. *Cahiers de Médecine Vétérinaire*, 1950, n° 3, 18). Le virus de la pneumopathie du cobaye passe également de la mère au fœtus à travers le placenta. (Rapport sur le fonctionnement de l'Institut Pasteur du Maroc, 1950).

- [5] S. NOCARD et E. LECLAINCHE. *Les maladies microbiennes des animaux*. Masson, édit. Paris, 1898.
- [6] E. LEMÉTAYER, L. NICOL, L. JACOB, O. GIRARD et R. CORVAZIER. *Ces Annales*, 1947, **73**, 297.

**RECHERCHES SUR LES FACTEURS
QUI CONDITIONNENT L'APPARTENANCE
DES BACILLES PARATYPHIQUES B
AUX DIFFÉRENTS TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES
DE FELIX ET CALLOW**

**I. — LA LYSOGÉNÉITÉ DES DIFFÉRENTS TYPES
DE *SALMONELLA PARATYPHI* B**

par PIERRE NICOLLE, YVES HAMON et EWALD EDLINGER (*).

(*Institut Pasteur, Service du Bactériophage et C. N. R. S.*)

L'emploi du bactériophage pour révéler des différences entre les cultures d'une même espèce remonte presque à la découverte de cet agent. Plusieurs méthodes ont été proposées dans le but de caractériser par les phages les types chez certaines espèces. Mais les résultats les plus intéressants ont été, sans conteste, apportés par Craigie et Yen, en 1938 [1], avec *S. typhi*, lorsque ces auteurs eurent découvert les exceptionnelles possibilités d'adaptation d'un bactériophage doué d'une affinité spécifique pour l'antigène Vi. Les types ainsi individualisés se sont montrés remarquablement stables et la méthode, éprouvée depuis dix ans dans de nombreux pays, s'est avérée très précieuse pour l'épidémiologie. Felix et Callow, en 1943 [2], ont mis au point une méthode de détermination des types de l'espèce *S. paratyphi* B se réclamant du même principe. La valeur pratique de cette méthode est entièrement comparable à celle de la méthode de Craigie.

Le tableau I représente un schéma incomplet et provisoire des réactions obtenues par Felix et Callow. Certaines de ces réactions sont encore inédites. Elles nous ont été communiquées par les auteurs. D'autre part, nous avons modifié l'ordre des différents types. Celui qui a été établi par Felix et Callow est le suivant : 1, 2, 3 a, 3 a 1, 3 b, Jersey, Beccles, Taunton, B. A. O. R. et Dundee.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} mars 1951.

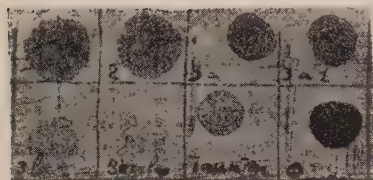
TABLEAU I.

TYPES des souches	PHAGES VI SPÉCIFIQUES DES TYPES DE <i>S. paratyphi</i> B										ANTI « O »
	1	2	3a	3a1	3b	B.A.O.R.	Beccles	Taunton	Dundee	Jersey	
1	LC	LC	+++	+++	++	—	— ou ++	— ou ++	—	—	LC
2	—	LC	—	—	—	—	—	—	—	—	LC
3a	—	—	LC	LC	LC	—	LC	< LC	—	—	LC
3a1	—	—	< LC	< LC	—	—	—	—	—	—	LC
3b	—	—	—	+	< LC	< LC	< LC	LC	< LC	+	LC
B.A.O.R.	—	—	—	+	— ou +++	< LC	—	—	—	—	LC
Beccles.	—	—	—	—	—	—	< LC	< LC	—	—	LC
Taunton.	—	—	—	—	—	—	—	< LC	—	—	LC
Dundee.	—	—	—	—	—	—	—	—	LC	—	LC
Jersey.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	LC	LC
Groupe Z	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	LC

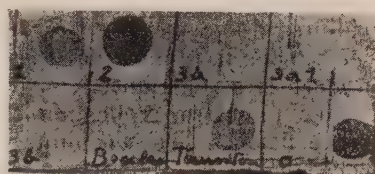
Schéma d'après Felix et Callow. — Les cases vides correspondent à des phages spécifiques dont l'action ne nous a pas été communiquée.
LC, lyse confluent; +++, très nombreuses plaques; ++, nombreuses plaques; + quelques plaques isolées.

TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES DE *S. PARATYPHI* B

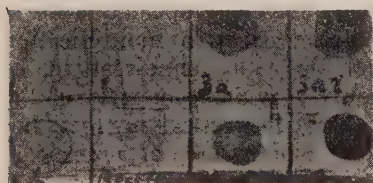
(FELIX et CALLOW, 1943.)



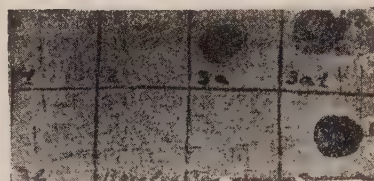
Type 1.



Type 2.



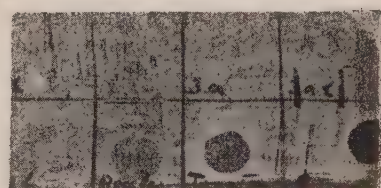
Type 3a.



Type 3a1.



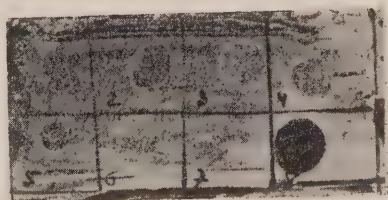
Type 3b.



Type Beccles.



Type Taunton.



Groupe « Z ».

FIG. 1.

Dans les conditions expérimentales de nos recherches, nous avons obtenu un schéma un peu différent, spécialement pour certaines réactions non spécifiques (Tableau II).

Sur le plan théorique, on peut se demander quelles sont les raisons des différences dans la sensibilité aux bactériophages des cultures d'une même espèce, en tous points semblables, par ailleurs, sous le rapport de leurs caractères morphologiques, biochimiques et sérologiques.

Une première explication se présentait à l'esprit : cette différence dans la lysosensibilité des cultures ne serait-elle pas la conséquence de différences dans la qualité des antigènes spécifiquement récepteurs de ces bactériophages ? A cette explication, Craigie (1946) [3] avait répondu par avance que la spécificité lytique des mutants du phage Vi du type II dépendait, non de la spécificité d'adsorption, mais de quelque facteur spécifique de la cellule-hôte, lequel détermine la pénétration et la multiplication du bactériophage. Dans l'état actuel de nos connaissances, ce facteur spécifique n'a pas été trouvé ; « Some aspects of the phage host-cell relationships are of great theoretical interest, but they are far from being completely understood at present ». (Craigie et Felix, 1947) [4].

En attendant que les progrès de la physiologie et de la biochimie microbienne viennent nous éclairer sur ce point, nous étions en droit de nous demander si la résistance, totale ou partielle, de certaines cultures pourvues de l'antigène indispensable, à divers bactériophages doués d'affinité spécifique pour cet antigène, n'était pas due à la lysogénéité de ces cultures. La lysogénéité en effet, c'est-à-dire la propriété, effective ou potentielle, d'une culture bactérienne de mettre en liberté spontanément dans le milieu un ou plusieurs bactériophages, se rencontre très fréquemment chez de nombreuses espèces. Elle s'accompagne généralement, dans les conditions normales, d'une résistance non seulement aux bactériophages qu'on peut extraire de ces cultures, mais encore aux bactériophages apparentés (Burnet, 1932) [5].

Il importe de faire remarquer que la non-lysogénéité, caractère négatif, ne peut en aucun cas être prouvée de façon absolue et définitive. La libération d'un bactériophage par une bactérie lysogène est un phénomène purement contingent. Elle dépend des conditions expérimentales et spécialement du milieu nutritif utilisé.

Lorsqu'au cours de ce travail nous admettons la non-lysogénéité d'un type de *S. paratyphi* B, cela signifie simplement qu'entre nos mains, et avec nos méthodes, nous n'avons pas réussi à déceler l'existence d'un bactériophage dans les cultures de ce type.

Le but de notre travail a été de déterminer quelle part revient

TABLEAU II.

TYPE des souches	PHAGES VI SPÉCIFIQUES DES TYPES DE <i>S. paratyphi</i> B.										PHAGE Anti « O »
	1	2	3a	3a-3b	3a1	3b	B.A.O.R.	Beccles	Taunton	Dundee	
1	LC	LC	LC		LC	LC		++	LC—		LC
2	+	LC	0		0	0		++	LC—		LC
3a	0	0	LC		LC	LCv		LC—	LC		LC
3a-3b	0	0	LC	LC	LC	0		LC—	LC		LC
3a1			LC		LC	0		+	++		LC
3b					++	LCv		+++	LC—		LC
B.A.O.R.	0	0	0		0	+++	LC	0	0		LC
Beccles.	0	0	0		0	0		LC—	LC—		LC
Taunton.	0	0	0 ou +		0 ou +	0		0	LC—		LC
Dundee.	0	0	0		0	0		0	0		LC
Groupe Z.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LC	LC

Schéma du laboratoire. — LC, lyse confluyente; LC —, lyse presque confluyente; +, 10 plages environ; ++, 100 plages environ; +++, plus de 100 plages.

à la lysogénéité dans la différenciation des cultures de *S. paratyphi* B en types bactériophagiques d'après la méthode de Felix et Callow.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Nous avons eu à notre disposition, outre les cultures-types de Felix et Callow, toutes les souches de *S. paratyphi* B reçues par le Centre de lysotypie de l'Institut Pasteur depuis 1948, soit environ 1 500 souches.

La lysotypie (1) (Nicolle, Jude et Buttiaux, 1950) [6] de ces cultures avait été pratiquée auparavant par la méthode de Felix et Callow légèrement modifiée.

Les types des cultures provenant des différentes régions de France appartenaient aux types 1 (1,4 p. 100), 3 *a* (0,35 p. 100), 3 *a* 1 (1,4 p. 100), 3 *b* (0,35 p. 100), Beccles (8,8 p. 100), Taunton (43,3 p. 100), Dundee (42,6 p. 100) et au groupe Z (1,5 p. 100). Le type 2 n'a jamais été rencontré. Parmi une centaine de cultures provenant d'Autriche (Nicolle, Jude et Hamon, 1951) [7], en dehors des types cités plus haut, un certain nombre de cultures présentaient des réactions anormales. Ces cultures pouvaient se répartir en deux groupes que nous avons étiquetés momentanément 3 *b* (moins Beccles et Taunton) et 3 *a* (moins 3 *b*), en raison de l'absence de réaction avec ces phages. La confirmation officielle de cette manière de voir nous a été donnée par la suite pour le premier de ces types anormaux : le Dr Felix et Miss Callow, à qui nous avons envoyé les cultures du groupe 3 *b* (moins Beccles et Taunton), les ont reconnus comme appartenant au type B. A. O. R., récemment identifié par eux (2). Nous ignorons encore si les cultures 3 *a* (moins 3 *b*) représentent un type nouveau, ou bien si elles doivent être assimilées à l'un des types déjà créés par ces auteurs.

La recherche de la lysogénéité a été faite par l'un ou l'autre des procédés classiques (Nicolle, Grabar et Gibert, 1946) [8]. Lorsqu'une culture a été reconnue lysogène, son phage a été extrait par la méthode suivante :

Dans un ballon de Kjeldahl, contenant 10 cm³ de bouillon, on introduit environ 40 ou 50 000 000 de germes provenant d'une culture de vingt-quatre heures, sur gélose inclinée, de la souche à étudier. Après cinq heures d'agitation mécanique au bain-marie à 37° C, la culture est filtrée sur bougie L3, le filtrat est conservé à la glacière. Il est

(1) La « lysotypie » est le terme que l'un de nous, avec Jude et Buttiaux, a proposé pour traduire l'expression anglaise « phage typing ».

(2) Nous adressons au Dr Felix et à Miss Callow nos plus sincères remerciements pour avoir bien voulu identifier les types des nombreuses souches que nous leur avons envoyées.

ensuite éprouvé sur une culture de *S. paratyphi* B du type 1 (toujours la souche B. 76 du type 1 de Felix et Callow). Pour cela, on ensemence une plaque de gélose (gélose, 1,5 p. 100 ; peptone UCLAF, 2 p. 100 ; NaCl, 0,5 p. 100) avec la souche type 1 et on dépose des gouttes du filtrat de place en place sur la surface ensemencée. Après vingt-quatre heures d'étuve, on examine l'emplacement des gouttes, à l'éclairage oblique, au moyen d'une forte loupe. Lorsque la présence de plages est constatée, on procède à l'isolement du bactériophage : on prélève avec le fil de platine un peu de la substance lysée au bord d'une plage bien séparée des autres. Ce matériel est ensuite délayé dans un peu de bouillon et mis cinq heures à l'étuve à 37° ; puis, on filtre et on répète l'épreuve sur la souche type 1. Après plusieurs isolements de plages, on peut considérer qu'on a obtenu un bactériophage de lignée pure.

Les phages extraits des types lysogènes ont été, sans aucune exception, régénérés sur la souche type 1 (B. 76) : nous avons choisi ce type parce qu'il est dépourvu de lysogénéité vis-à-vis des autres types de l'espèce *S. paratyphi* B et qu'il présente, d'autre part, une sensibilité étendue, non seulement à tous les phages Vi utilisés pour la lysotypie, mais aussi à tous les phages de lysogénéité des autres types. Les titrages des bactériophages ainsi régénérés s'opèrent par la méthode dite « à la goutte » (Nicolle, 1949) [9].

La recherche de la gamme de lysosensibilité des cultures de *S. paratyphi* B se pratique de la manière suivante : 42 carrés numérotés sont tracés à l'encre à marquer le verre (formule de J.-M. Desranleau) sur la face extérieure du fond d'une boîte de gélose. La surface de la gélose est ensemencée avec la culture à étudier. Au centre de chacun des carrés, on dépose à la pipette effilée 1 goutte d'un des phages préparés comme il a été indiqué plus haut. Après vingt-quatre heures d'étuve, les résultats sont notés. Pour simplifier la lecture des tableaux, nous n'avons tenu compte que des actions certaines (+ = action lytique positive, O = aucune action visible).

Les phages extraits des cultures lysogènes ont été soumis à des épreuves sérologiques. Cinq sérums anti-phages ont été préparés avec les phages extraits de la culture B. 228 du type 2, de Felix et Callow, de la culture B. 1305 du type 3a1 de Felix et Callow, de la culture du type Beccles de Felix et Callow, de la culture du type Taunton de Felix et Callow et d'une culture du type Dundee. La préparation des sérums et leur emploi ont été pratiqués suivant les techniques de l'injection unique au lapin et de la neutralisation à la goutte (Nicolle et Ducrest, 1948 [10]).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1° RECHERCHE DE LA LYSOGÉNÉITÉ DES CULTURES APPARTENANT AUX DIFFÉRENTS TYPES ET DE LA GAMME D'ACTIVITÉ DES PHAGES EXTRAITS

DE CES CULTURES (tableau III). — *Type 1.* — Neuf cultures du type 1 ont été examinées : les 2 souches types (B. 76 et B. 309) de Felix et Callow et 7 autres souches isolées en France.

Les filtrats se sont montrés dépourvus d'action sur les cultures des différents types. Le type 1 semble donc dépourvu de lysogénéité pour l'espèce *S. paratyphi* B. Remarquons que Scholtens, 1950 [41] a également constaté l'absence de lysogénéité vis-à-vis des cultures de *S. paratyphi* B, mais il a obtenu, à partir de cultures du type 1, un phage actif sur la souche 65 de *Salmonella dublin* (3).

Type 2. — Nous n'avons pu examiner que les deux cultures types de Felix et Callow (B. 228 et B. 300). Ces deux cultures élaborent un phage qui s'est montré actif sur toutes les souches de *S. paratyphi* B, à l'exception des deux cultures du type 2.

Le type 2 est donc lysogène et son phage possède une gamme d'activité très étendue. Ce phage est déterminant pour le type (4).

Type 3 a. — Trois cultures de ce type ont été utilisées, dont les deux souches types (B. 62 et B. 365). Les filtrats étaient dépourvus d'activité lytique sur les souches des différents types de *S. paratyphi* B. Le type 3 a ne serait pas lysogène pour l'espèce *S. paratyphi* B; nos résultats sont en désaccord sur ce point avec ceux de Scholtens, qui admet que la souche type 3 a (B. 365) élabore le même phage que la souche type 3 a 1 (B. 1305). Cependant, il considère l'autre souche type 3 a (B. 62) comme non lysogène.

Type 3 a (moins 3 b) [type provisoire]. — Nous ne possédons pas de souches-types. Six cultures de ce type ont été examinées : leurs filtrats contiennent toujours un bactériophage actif sur les cultures des types 1, 3 a, 3 b et B. A. O. R. identique à notre type provisoire 3 b (moins Beccles et Taunton).

Donc, à l'opposé du type 3 a, le type 3 a (moins 3 b) est toujours lysogène. Cette lysogénéité constante et les résistances qu'elle détermine vis-à-vis de certains phages types nous font penser que les cultures répondant à ce schéma composent un type nettement distinct du type 3 a. Nous ignorons encore si ce type correspond à l'un des derniers types admis par le « Central Enteric Reference Laboratory » de Londres.

Type 3 a 1. — Les 2 souches types (B. 624 et B. 1305) et 6 autres cultures de ce type ont été étudiées. Trois cultures, dont la souche

(3) Nous avons eu l'occasion de reproduire l'expérience de R. Th. Scholtens avec sa souche n° 65 de *S. Dublin*. Les 4 échantillons de *S. paratyphi* B, Type 1, que nous avons examinés se sont montrés lysogènes vis-à-vis de cette souche. Nous prions le Dr Scholtens de bien vouloir agréer nos remerciements pour son envoi.

(4) Voir dans la discussion du deuxième mémoire la définition des termes : phage déterminant et phage indifférent.

TABLEAU III.

TYPE (SOUCHES)	PHAGES EXTRAITS DES TYPES										ANTI « O » de F. et C.
	1	2 (2)	3a	3a-3b (6)	3a1 B 1305 (3)	3a1 B 624 (4)	3b	B. A. O. R. (10)	Beccles (4)	Taunton (10)	Dundee (13)
1 (9)	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+
2 (2)	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	+
3a (3)	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+
3a-3b	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0	+
3a1 B 1305 (5)	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+
3a1 B 624 (3)	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	+
3b (5)	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+
3b (moins Beccles et Taunton) B. A. O. R. (44),	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+	+
Beccles (25)	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+
Taunton (62)	0	+	0	0	0	0	0	0	0 ou + [★]	0	+
Dundee (83)	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+

+, action lytique positive. 0, aucune action visible.

Les chiffres gras entre parenthèses indiquent le nombre des cultures utilisées. Exemple : « Phages Taunton (40) » signifie que les phages extraits de 40 cultures du type Taunton ont été étudiés. « Dundee (83) » signifie que 83 échantillons du type Dundee ont été éprouvés.

type B. 624, ont donné des filtrats et des phages actifs sur les souches des types 1, 2, 3 a, 3 a 1 (souche B. 1305 et 4 autres du même type), 3 b, Beccles, Taunton, Dundee et B. A. O. R. Cinq cultures, dont la souche type B. 1305, fournissent des filtrats et des phages actifs sur les souches des types 1, 3 a, 3 b et B. A. O. R.

Le type 3 a 1 est donc lysogène, mais il montre une double lysogénéité. Nous verrons plus loin, au paragraphe consacré à la sérologie, que certaines souches de ce type, les plus fréquentes (groupe de la souche type B. 624), possèdent 2 phages : un phage principal commun à toutes les souches de ce type et un phage secondaire, actif sur 1, 2, 3 a, 3 a 1 (B. 1305), 3 b, Beccles, Taunton, Dundee et B. A. O. R., qui manque dans le second groupe de souches (groupe de la souche type B. 1305). Ce phage secondaire est toujours le même chez les souches qui le possèdent. Seul le phage principal commande l'appartenance au type (*phage déterminant*). Le second phage est donc dit *indifférent*.

Notons que Scholtens a également signalé l'hétérogénéité de ce type sous le rapport des propriétés lysogènes.

Type 3 b. — Les 2 souches types de Felix et Callow (B. 87 et B. 656) et 3 autres cultures ont été étudiées. Les filtrats n'ont montré aucune action sur les souches types. Le type 3 b peut être considéré comme non lysogène vis-à-vis de l'espèce *S. paratyphi* B. Ces résultats sont en accord avec ceux de Scholtens.

Type 3 b (moins Beccles et Taunton) [désignation provisoire]. — Nous ne possédons pas de souches types. Onze cultures provenant toutes d'Autriche avaient donné à la lysotypie un schéma rappelant celui du type 3 b, mais sans réaction avec les phages Beccles et Taunton. D'autre part, les souches de ce genre étaient toutes lysogènes. Elles contenaient un phage unique, le même pour toutes. Nous étions dès lors autorisés à les considérer comme formant un type autonome. Le phage de ces 11 cultures montre une gamme d'activité très étendue : types 1, 2, 3 a (moins 3 b), 3 a 1 (B. 1305), 3 b, Beccles.

Ces cultures ont été adressées au Dr Felix. Celui-ci les a identifiées comme appartenant au nouveau type B. A. O. R. (5).

Les réactions lytiques anormales présentées à la lysotypie par ces cultures nous avaient déjà clairement montré que celles-ci étaient nettement différentes de celles du type 3 b, et qu'il convenait de créer pour elles un type distinct.

Type Beccles. — La souche type de Felix et Callow et 3 autres cultures essayées sur 214 cultures des divers types ont donné des filtrats actifs sur les cultures des types 1, 3 a et 3 b. Le type Beccles est lysogène, on verra plus loin que la sérologie nous a

(5) B. A. O. R. : British Army of Rhine.

permis d'isoler 2 bactériophages dans les filtrats de quelques souches du type Beccles.

Type Taunton. — La souche type de Felix et Callow et 9 autres cultures essayées sur 214 cultures ont permis d'obtenir des filtrats et des phages actifs sur les cultures des types 1, 3 a, 3 b et Beccles. La sérologie et la préparation de types artificiels au moyen des phages isolés nous ont montré que les cultures du type Taunton contenaient toujours 2 bactériophages. Contrairement au type 3 a 1, dont le phage secondaire ne joue aucun rôle dans l'appartenance au type, les 2 phages du type Taunton sont déterminants (voir notre second mémoire).

Type Dundee. — Nous n'avons pas eu de culture type. Treize cultures de souches provenant de diverses régions de France ont été essayées sur 214 souches de types divers.

Tous les filtrats et les phages extraits de ces cultures agissent sur les types 1, 2, 3 a, 3 a 1 (B. 1305), 3 b, B. A. O. R. et Beccles. La sérologie et la préparation de types artificiels ont mis en évidence la présence de 2 phages, tous deux déterminants.

Groupe Z. — Nous n'avons pu examiner que 2 souches de ce groupe. Elles sont toutes les deux lysogènes et le phage de l'une agit sur les souches du type Dundee.

2° ETUDE SÉROLOGIQUE DES PHAGES DE LYSOGÉNÉITÉ EXTRAITS DES DIFFÉRENTS TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES DE « S. PARATYPHI » B. — *Phages du type 2.* — Nous avons dû limiter cette étude sérologique aux 2 souches types de Felix et Callow, puisque le Centre de lysotypie n'a reçu aucune souche de ce type. Les phages des souches B. 228 et B. 300 ne semblent pas apparentés sérologiquement, malgré la similitude de leur gamme d'activité.

Les bactériophages isolés de ces souches types ne sont pas neutralisés par les sérums préparés avec les phages des types 3 a 1, Beccles, Taunton, Dundee et 3 a [moins 3 b] (6).

Inversement, le sérum préparé avec le phage 2 provenant de la souche B. 300 ne donne lieu à aucune neutralisation avec les phages extraits des types 3 a 1, Beccles, Taunton, Dundee et B. A. O. R. Les phages extraits du type 2 forment donc un groupe sérologique distinct de celui des phages extraits de tous les autres types. Le sérum anti-type 2 neutralise très légèrement les phages extraits des cultures 3 a (moins 3 b) [5 p. 100 des corpuscules à la dilution à 1 p. 100].

Phage du type provisoire 3 a (moins 3 b). — L'étude sérologique des phages extraits des cultures 3 a (moins 3 b) a montré qu'ils forment la transition entre les phages extraits des cultures

(6) Il ne nous a pas été encore possible de préparer un sérum avec le phage des types B. A. O. R. Nous y reviendrons ultérieurement.

du type 2 et le groupe des bactériophages primaires extraits des types 3 a 1, Beccles, Taunton et Dundee.

Groupe des phages uniques ou primaires, facilement isolables des types 3 a (moins 3 b), 3 a 1, Beccles et Taunton. — La sérologie ne permet pas de différencier ces divers bactériophages entre eux. Leur taux de neutralisation croisée très voisin confirme de façon évidente leur étroite parenté. A titre d'exemple, par rapport à un sérum donné de ce groupe, l'étude sérologique donne les résultats suivants :

	TAUX DE NEUTRALISATION par le sérum obtenu avec le phage extrait du type Taunton
Phage unique extrait du type 3 a (moins 3 b).	60 p. 100 au 1/5 000.
Phage primaire extrait du type 3 a 1	50 p. 100 au 1/5 000.
Phage primaire extrait du type Beccles . . .	20 p. 100 au 1/5 000.
Premier phage extrait du type Taunton. . .	50 p. 100 au 1/5 000.
Premier phage extrait du type Dundee . . .	Partielle au 1/2 000.

La technique de neutralisation que nous avons employée s'est donc montrée incapable de confirmer les différences très nettes révélées par l'étude de la gamme d'activité et par la préparation des types artificiels. Il devrait être possible de la rendre plus efficace. Notons cependant que Scholtens a rencontré les mêmes difficultés, puisqu'il considère tous ces phages comme identiques.

D'autre part, l'étude sérologique a mis en évidence un deuxième phage dans les cultures des types Beccles, Taunton et certaines cultures du type 3 a 1 (B. 624 de Felix et Callow). Ce second phage a pu être isolé à partir des plages formées malgré l'action du sérum spécifique obtenu avec le premier phage purifié. Le filtrat régénéré, mais non purifié, de certaines cultures a été soumis à l'action neutralisante d'un sérum.

Deuxième phage 3 a 1 extrait du groupe B. 624. — Alors que dans certains cas (phages extraits du type 3 a 1 (B. 1305), le filtrat régénéré d'une culture de ce type subissait une neutralisation totale avec une dilution au 1/100 d'un sérum préparé au moyen d'un bactériophage du groupe 3 a 1 (B. 1305) rigoureusement purifié, pour certains filtrats régénérés du groupe 3 a 1 (B. 624), on obtenait exceptionnellement une neutralisation partielle avec la même dilution de sérum.

Les plages apparues malgré le sérum étaient manifestement produites par un second phage résistant à l'action neutralisante. Ce second phage, facilement isolable à partir de ces plages, présentait, en outre, une gamme d'activité différente. La présence de ce second phage dans les cultures du groupe 3 a 1 (B. 624) explique les discordances observées dans la gamme d'activité des filtrats des cultures de ce groupe par rapport à ceux du groupe 3 a 1 (B. 1305).

Deuxième phage du type Beccles. — Nous avons constaté également, par l'étude sérologique, la présence d'un second phage dans les cultures du type Beccles. L'obtention de ce phage à partir des filtrats n'a pu être réalisée qu'exceptionnellement dans les conditions de nos expériences.

Deuxième phage du type Taunton. — La neutralisation partielle par le sérum préparé avec un phage purifié extrait du type Taunton a révélé également la présence d'un second phage. Le second phage du type Taunton possède une individualité propre. La sérologie n'a permis de l'assimiler à aucun des autres phages déterminants isolables directement à partir des filtrats : les sérums préparés avec les phages extraits des types 2, 3 a 1, Beccles, Taunton et Dundee ne produisent aucune neutralisation du second phage extrait du type Taunton. Nous nous proposons de chercher ultérieurement s'il peut être identifié à l'un des seconds phages des autres types.

La sérologie des phages extraits du type Taunton montre que les filtrats utilisés dans le tableau I ne contiennent presque toujours que le premier phage. L'isolement des 2 bactériophages ou du second exclusivement a été exceptionnel dans les conditions opératoires que nous avons adoptées. Sur 20 filtrats d'origine très variable, préparés en vue de la sérologie, 2 seulement contenaient le second phage à l'état pur. Il s'agissait de 2 *S. paratyphi* B du type Taunton originaires du département du Bas-Rhin.

Ce second phage, malgré les difficultés pour l'obtenir, existe chez toutes les souches du type Taunton, car la préparation des types artificiels nous a montré que le second phage était déterminant pour l'appartenance au type, au même titre que le premier phage.

Phages extraits du type Dundee. — Les taux de neutralisation de 20 filtrats de cultures appartenant au type Dundee varient entre 1/7 et 1/10 d'une part, et 1/50 et 1/60 d'autre part, suivant qu'on utilise pour le titrage du bactériophage traité par le sérum neutralisant la culture type 1 (44231) ou la culture type 1 (B. 76). Les taux de neutralisation croisée permettent, dans le cas du type Dundee, une discrimination relativement facile du premier phage déterminant (facilement isolable) de ce type, d'avec ceux qui ont été isolés des autres types ; le bactériophage déterminant l'appartenance au type 3 a 1 s'est montré le plus apparenté, avec un taux de neutralisation de 5 p. 100 à la dilution à 1/5 000. L'étude sérologique confirme donc les déductions déjà tirées de l'examen de la gamme d'activité : les bactériophages isolés des différentes cultures du type Dundee sont très voisins, sinon identiques.

L'étude de sérologie prouve, d'autre part, la présence d'un second bactériophage dans les cultures du type Dundee par la

neutralisation partielle, avec le sérum au 1/100, du matériel de lysogénéité isolé de certaines souches. Comme pour les cultures des types Beccles et Taunton, la difficulté de l'isolement de ce deuxième phage laisse toute sa valeur à la méthode d'identification du premier phage déterminant par sa gamme d'activité. La sérologie montre, en effet, par la neutralisation totale de ces phages Dundee aux dilutions à 1/100, 1/500 et 1/1 000 du sérum, que les cultures du type Dundee libèrent presque toujours exclusivement leur premier phage déterminant dans les conditions d'isolement précitées.

La méthode sérologique établit la proche parenté des phages primaires extraits des cultures du type Dundee avec les phages primaires extraits des types Beccles et Taunton.

Phage du type B. A. O. R. — Nous n'avons obtenu aucune neutralisation de ce phage par les sérums préparés avec les phages précédents. Le phage du type B. A. O. R. est sérologiquement distinct des autres phages étudiés.

DISCUSSION.

1° Caractère constant de l'état lysogène ou de l'état non lysogène suivant le type.

Nos résultats montrent clairement que certains types, les plus nombreux, sont toujours lysogènes (types officiels 2, 3 a 1, B. A. O. R., Beccles, Taunton, Dundee et le groupe Z), et notre type provisoire 3 a (moins 3 b), tandis que les autres (types 1, 3 a et 3 b) ne paraissent pas lysogènes : du moins, dans les conditions de nos expériences, sauf exceptions dues vraisemblablement à des contaminations accidentelles, ils n'ont pas libéré de bactériophage (tableau IV).

TABLEAU IV. — « États » de lysogénéité des types de *S. paratyphi* B.

TYPES provisoirement admis comme non lysogènes (pour l'espèce)	TYPES LYSOGÈNES		
	à un seul phage	à deux phages	
		un seul déterminant	les deux nécessaires
1 3 a 3 b	2 3 a (moins 3 b) 3 a 1 (B. 1305) B. A. O. R. Groupe Z	3 a 1 (B. 624) Beccles.	Taunton. Dundee.

2° Fréquence de la lysogénéité chez *S. paratyphi* B.

Dans un travail antérieur, l'un de nous, avec J. Grabar et

P. Gibert (1946) [8], avait montré, en confirmation des résultats de Burnet (1932) [5], la grande fréquence de la lysogénéité parmi les cultures de *S. paratyphi* B (62 p. 100). Mais, à l'époque, nous n'avions à notre disposition, comme bactéries révélatrices, que des souches autochtones, reconnues depuis lysogènes. Ces souches, par le fait de leur lysogénéité, étaient résistantes à certains des phages des autres souches. La pratique de la lysotypie par la méthode de Felix et Callow a mis entre nos mains des souches non lysogènes, d'une très grande sensibilité aux phages de l'espèce, en particulier des cultures du type 1, relativement rares en France. Elle nous a fourni, en outre, toute la gamme de types de *S. paratyphi* B actuellement connus dans le monde ; ce qui nous a permis d'acquérir une vue d'ensemble de l'espèce sous le rapport de la lysogénéité.

Les types les plus fréquents en France, c'est-à-dire les types Taunton, Dundee et Beccles (formant à eux trois environ 96 p. 100 des souches), sont lysogènes. Les types considérés comme non lysogènes sont au contraire très rares ou même exceptionnels dans notre pays.

La lysogénéité des bacilles paratypiques B est donc, de ce fait, encore plus générale, chez nous, qu'elle ne nous avait semblé lors de notre premier travail.

Scholtens (1950) [11] a étudié, lui aussi, la lysogénéité des cultures de *S. paratyphi* B isolées en Hollande. Il n'avait pas réussi à typer plus de 15 p. 100 des souches recueillies dans son pays avec les 5 premiers phages de Felix et Callow (1, 2, 3 a, 3 a 1 et 3 b). Grâce à la recherche systématique de la lysogénéité et à l'étude des phages extraits, il a pu individualiser, dans le groupe des cultures non caractérisables, plusieurs nouveaux types : Kampen, Midwoud, Sittard et Cappel a/d Ijssel. Certains de ces types, d'après Felix (communication personnelle), correspondent aux nouveaux types créés par lui et Miss Callow : types Taunton, Beccles et Dundee (7). Pour Scholtens, la recherche de la lysogénéité semble donc devoir constituer une méthode auxiliaire à la lysotypie.

3° Pour un type donné qui possède le pouvoir lysogène, toutes les souches, quelle que soit leur provenance, présentent le même matériel de lysogénéité. Certains types lysogènes n'hébergent qu'un seul phage, identique chez toutes les souches du type, mais différent d'un type à l'autre. Ce sont les types 2, 3 a 1 (B. 1305).

(7) R. Th. SCHOLTENS (lettre du 10 mars 1951) a bien voulu nous donner la correspondance de ses types avec ceux de Felix et Callow : Type Kampen = Taunton ; Type Leeuwarden = Dundee et 3 a 1 (B. 624) ; Type Schiedam = 3 a 1 (B. 1305) ; Types Midwoud, Sittard et Cappel a/d Ijssel = Beccles. Nous l'en remercions vivement.

B. A. O. R., 3 a (moins 3 b) et certaines souches du groupe Z. Les autres types lysogènes contiennent 2 bactériophages : ce sont les types 3 a 1 (B. 624), Beccles, Taunton et Dundee. Ces phages sont également identiques chez les souches d'un même type, mais différents d'un type à l'autre.

4° Les souches des différents types de *S. paratyphi* B présentent des schémas de sensibilité très variés aux différents phages extraits des types lysogènes, mais toutes les souches d'un même type se comportent vis-à-vis de ces phages de la même façon.

L'uniformité de réaction des souches d'un type donné en présence de ces phages non adaptés et non dilués permet de grouper ces souches, et chacun de ces groupements coïncide avec un des types de Felix et Callow. Cette constatation indique que la division en types telle qu'elle a été établie par ces auteurs n'est pas due à de simples contingences, mais à des caractères profondément imprimés dans la cellule bactérienne.

La discussion concernant les rapports qui unissent l'état lysogène à l'état non lysogène pour différents types de Felix et Callow sera abordée à la fin du deuxième mémoire.

RÉSUMÉ.

Parmi les types de bacille paratyphique B déterminés par la méthode de Felix et Callow, certains, les plus nombreux, sont constamment lysogènes, d'autres, entre nos mains tout au moins, ne se sont pas montrés lysogènes pour l'espèce *S. paratyphi* B.

Pour un type donné, l'état de lysogénéité est constant. Il est défini par : 1° l'absence ou la présence du pouvoir lysogène vis-à-vis de l'espèce *S. paratyphi* B ; 2° le nombre des phages présents ; 3° la qualité de ces phages.

Il y a des types lysogènes à un phage : 2, 3 a (moins 3 b), 3 a 1 (groupe B. 1305), et certaines souches du groupe Z. Il y a des types lysogènes à deux phages : 3 a 1 (groupe B. 624), Beccles, Taunton et Dundee. Enfin, pour les types 1, 3 a et 3 b, nous n'avons pas pu mettre la lysogénéité en évidence.

La sérologie de ces phages a permis de les répartir en 7 groupes. 1^{er} groupe : phage unique, déterminant, extrait du type 2 ; 2^e groupe : phages uniques ou primaires, déterminants, extraits des types 3 a (moins 3 b), 3 a 1 (les 2 groupes B. 1305 et B. 624), Beccles, Taunton et Dundee ; 3^e groupe : phage unique, déterminant, extrait du type B. A. O. R. ; 4^e groupe : phage secondaire, semi-déterminant, extrait du type Taunton ; 5^e groupe : phage secondaire, semi-déterminant, extrait du type Dundee ; 6^e groupe : phage secondaire, indifférent, extrait du type 3 a 1 (B. 624) ; 7^e groupe : phage secondaire, indifférent, extrait du type Beccles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. CRAIGIE et C. H. YEN. *Canad. Publ. Health J.*, 1938, **29**, 448-484.
- [2] A. FELIX et B. R. CALLOW. *Brit. Med. J.*, 1943, **2**, 127.
- [3] J. CRAIGIE. *Bact. Rev.*, 1946, **10**, 73.
- [4] J. CRAIGIE et A. FELIX. *Lancet*, 1947, **252**, 824.
- [5] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1932, **35**, 851.
- [6] P. NICOLLE, A. JUDE et R. BUTTIAUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 246.
- [7] P. NICOLLE, A. JUDE et Y. HAMON. *Rev. Immunol.*, 1951 (à paraître).
- [8] P. NICOLLE, J. GRABAR et P. GIBERT. *Ces Annales*, 1946, **72**, 81.
- [9] P. NICOLLE. *Biol. Med.*, 1949, **38**, 13.
- [10] P. NICOLLE et P. DUCREST. *Ces Annales*, 1948, **74**, 85.
- [11] R. Th. SCHOLTENS. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1950, **16**, 256.

**RECHERCHES SUR LES FACTEURS
QUI CONDITIONNENT L'APPARTENANCE
DES BACILLES PARATYPHIQUES B
AUX DIFFÉRENTS TYPES BACTÉRIOPHAGIQUES
DE FELIX ET CALLOW**

**II. — OBTENTION EXPÉRIMENTALE,
A PARTIR DES CULTURES NON LYSOGÈNES,
DES TYPES DE *S. PARATYPHI* B PAR CONTAMINATION
AVEC LES BACTÉRIOPHAGES EXTRAITS DES TYPES LYSOGÈNES**

par YVES HAMON et PIERRE NICOLLE (*).

(*Institut Pasteur. Service du Bactériophage.*)

La recherche de la lysogénéité chez *S. paratyphi* B des différents types de Felix et Callow a permis de répartir ces types en deux groupes : un premier groupe provisoirement admis comme non lysogène (types 1, 3 a et 3 b) et un deuxième groupe de types lysogènes : types 2, 3 a 1 (B. 624) et 3 a 1 (B. 1305), Beccles, Taunton, Dundee et B. A. O. R. auxquels nous pouvons ajouter un nouveau type (3 a moins 3 b) qui correspond peut-être à l'un des nouveaux types créés par Felix et Callow. L'étude approfondie des bactériophages de lysogénéité des souches du deuxième groupe a montré que deux éventualités pouvaient se présenter :

1° Les souches appartenant à certains types : 2, 3 a 1 (B. 1305), B. A. O. R., 3 a (moins 3 b), hébergent un seul phage, toujours le même pour un type donné.

2° Les souches des autres types : 3 a 1 (B. 624), Beccles, Taunton et Dundee hébergent deux phages distincts l'un de l'autre. Chacun de ces phages est identique ou très voisin chez toutes les cultures d'un même type [1].

Ces résultats indiquent clairement qu'il existe un lien entre l'appartenance d'une souche de *S. paratyphi* B à l'un des 7 types lysogènes et le ou les bactériophages constamment présents dans les cultures de ce type.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} mars 1951.

D'autre part, nous savons que les types bactériophagiques de *S. paratyphi* B résistent, comme la lysogénéité, aux actions, même brutales, des agents physiques et chimiques (Nicolle, Jude et Buttiaux, 1950 [2]). Le parallélisme de comportement entre la lysogénéité et le type constitue un argument de plus en faveur de leurs rapports réciproques.

La seule cause d'altération des types que nous connaissions jusqu'à présent (Nicolle, Jude et Buttiaux, 1950 [2]) réside dans la contamination, accidentelle ou expérimentale, des cultures par un phage exogène.

Dans un foyer de fièvre paratyphoïde B du type Taunton, un porteur de germes ayant fourni auparavant 4 souches du même type a donné par coproculture un bacille du groupe Z (groupe des bacilles non caractérisables). Par la suite, on obtint, chez ce même individu, régulièrement, des bacilles du type Taunton. La culture anormale fut traitée par le formol (ensemencement d'une boîte de gélose avec une suspension dense du bacille, dépôt de 1 goutte de formol dilué au 1/10 au centre de la gélose ; après trois ou quatre jours d'incubation à 37°, prélèvement des colonies développées à la limite de la zone bactéricide du formol. Ces colonies sont généralement débarrassées de leur phage de contamination (Nicolle, 1947 [3]). Après un semblable traitement, certaines subcultures ont donné les réactions du type Taunton.

Nous pourrions citer plusieurs autres exemples d'altération du type par des contaminations bactériophagiques, avec retour au type initial sous l'influence du formol.

Ces modifications du type sous l'influence d'un phage de contamination nous ont amenés à nous demander quel effet produirait le traitement des cultures des types admis comme non lysogènes par les phages extraits des types lysogènes. A partir des mutants résistants à ces phages (colonies secondaires), n'obtiendrait-on pas expérimentalement des types artificiels analogues aux types naturels, tout au moins sous le rapport de leur sensibilité aux phages de la lysotypie ?

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Des cultures des types considérés comme non lysogènes sont traitées, sur boîte de gélose, par l'un des bactériophages de lysogénéité régénéré sur la souche type 1 (B. 76). Au centre du placard de lyse formé dans la couche bactérienne après douze heures d'incubation à 37° C, on prélève une ou plusieurs colonies secondaires qu'on ensemence sur gélose inclinée.

Les résultats de la lysotypie portant sur plus de 100 cultures secondaires ainsi obtenues sont résumés dans les tableaux I, II, III et IV.

TABLEAU I. — Préparation de types artificiels à partir du type 1.

CULTURES SECONDAIRES obtenues par action du	Sur une culture du type	BACTÉRIOPHAGES DE LYSOTYPIC (Phages Vi de Felix et Callow)							
		1	2	3a	3a1	3b	Beccles	Taunton	Dundee
2	1	++ ou LC	LC	0	0	0	+++	LC —	LC
3a (— 3b)	1	LC	LC	+ ou LC	0 ou LC	0	LC —	LC —	LC
Primaire 3a4	1	LC	LC	LC	LC	0	0	++	LC
B. A. O. R.	1	LC	LC	LC	LC	LC	0 ou +	0 ou ++	LC
Primaire Beccles.	1	LC	LC	LC	LC	0	0	+++	LC
Primaire Taunton.	1	LC	LC	0	0	0	0	0	LC
Primaire Dundee.	1	LC	LC	LC	LC	0	0	+++	LC
Primaire + secondaire Dundee.	1	LC	LC	LC	0	0	0	0	LC

LC, lyse non conducente; LC — lyse presque conducente; +, 10 plages environ; ++, 100 plages environ; +++, plus de 100 plages. (Les types artificiels correspondant à des types naturels sont encadrés d'un double trait)

TABLEAU II. — Préparation de types artificiels à partir du type 3a.

CULTURES SECONDAIRES OBTENUES par action du		BACTÉRIOPHAGES DE LYSOTYPIC (Phages Vi de Felix et Callow)							
Phage isolé du type	Sur une culture du type	1	2	3a	3a1	3b	Beccles	Taunton	Dundee
2	3a	0	0	+++ ou LC	+++ ou LC	LC	++ ou LC	LC—	LC
3a (—3b)	3a	0	0	LC	LC	0	LC	LC—	LC
Primaire 3a1.	3a	0	0 ou +	+++ ou LC	+++ ou LC	0	LC—	LC—	LC
B.A.O.R.	3a	0	0	LC	LC	LC	0	0	LC
Primaire Beccles.	3a	LC	LC	LC	LC	0	+++	LC	LC
Primaire Taunton.	3a	0	0	LC	LC	0	LC—	LC	LC
Primaire Dundee.	3a	0	0	LC	LC	0	LC	LC	LC
Primaire + secondaire Dundee.	3a	0	0	LC	LC	0	0	0	LC

Pour la légende, voir le tableau I.

Pour la légende, voir le tableau I.

TABLEAU III. — Préparation de types artificiels à partir du type 3b.

CULTURES SECONDAIRES OBTENUES par action du		BACTÉRIOPHAGES DE LYSOTYPIC (Phages Vi de Felix et Callow)							
Phage isolé du type	Sur une culture du type	1	2	3 a	3 a 1	3 b	Beccles	Taunton	Dundee
3 a (— 3 b).	3 b	0	0	0	0	0	LC —	LC —	LC
Primaire 3 a 1.	3 b	0	0	0	0	0	LC —	LC	LC
B. A. O. R.	3 b	0	0	0	0 ou +	LC	0	0	LC
Primaire Beccles.	3 b	0	0	0	0	0	LC —	LC	LC
Primaire Taunton.	3 b	0	0	0	0	0	LC	LC	LC
Primaire + secondaire Taunton.	3 b	0	0	0 ou +	0 ou +	0	0	LC —	LC
Primaire Dundee.	3 b	0	0	0	0	0	LC —	LC	LC
Primaire + secondaire Dundee.	3 b	0	0	0	0	0	0	0	LC

Pour la légende, voir tableau I.

Pour la légende, voir tableau I.

TABLEAU IV. — Préparation de types artificiels à partir du type lysogène B.A.O.R.

CULTURES SECONDAIRES obtenues par action du		BACTÉRIOPHAGES DE LYSOTYPIC (Phages Vi de Felix et Callow)							
Phage isolé du type	Sur une culture du type	1	2	3 a	3 a 1	3 b	Beccles	Taunton	Dundee
Primaire Dundee.	B.A.O.R.	0	0	0	0	0	0	0	LC
Primaire Taunton ou 3 a 1.	B.A.O.R.	0	0	0	0	0	0	0	LC
2	3 a (— 3 b)	0	0	+++ ou LC	+++ ou LC	0	+ ou LC	++ ou LC—	LC

Pour la légende, voir le tableau I.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

1° La lecture de ces tableaux montre que les cultures des types considérés comme non lysogènes (1, 3 a, 3 b) ont donné naissance à des cultures secondaires profondément modifiées dans leur sensibilité aux phages types.

Dans certains cas, les réactions constatées n'offraient aucune ressemblance avec celles des types de Felix et Callow (schémas atypiques). Dans d'autres cas, au contraire, on a obtenu des types artificiels, exactement identiques aux types naturels (types normaux, encadrés de doubles traits). C'est ainsi que les cultures du type 1, traitées par le phage extrait du type 2, ont donné un schéma de lysotypie correspondant à celui du type 2 naturel (tableau I) ; les cultures du type 3 a (tableau II) : 1° traitées par le phage extrait du type 3 a 1 (B. 1305), ont donné le schéma du type 3 a 1 ; 2° traitées par le phage extrait du type provisoire 3 a (moins 3 b), les mêmes cultures ont donné le schéma du type 3 a (moins 3 b). Les cultures du type 3 b (tableau III) : 1° traitées par le phage primaire, facilement isolable, extrait du type Beccles, ont donné le schéma du type Beccles ; 2° traitées par les deux phages extraits du type Taunton, elles ont donné le schéma du type Taunton ; 3° traitées par les deux phages extraits du type Dundee, elles ont donné le schéma du groupe Z ; n'ayant pas encore à notre disposition le phage Vi type Dundee de Felix et Callow, nous ne sommes pas en mesure de préciser si le type artificiel obtenu correspond, comme on a le droit de le penser, au type Dundee ; 4° les cultures du type 3 b traitées par le phage

extrait du type B. A. O. R. ont donné le schéma du type B.A.O.R.; ne disposant pas du phage spécifique du type B. A. O. R., nous n'avons pu identifier ce type que par les réactions hétérologues observées constamment avec les autres phages types, c'est-à-dire le schéma 3 *b* (moins Beccles et Taunton).

Les cultures du type B. A. O. R. (tableau IV), traitées par le phage primaire, facilement isolable, extrait du type Dundee, ont donné également le schéma du groupe Z. Pour la même raison énoncée plus haut, nous ignorons si le type artificiel obtenu correspond également, dans ce cas, au type Dundee.

En résumé, à partir du type 1, nous avons pu préparer artificiellement le type 2; à partir du type 3 *a*, nous avons obtenu les types 3 *a* (moins 3 *b*) et 3 *a* 1; à partir du type 3 *b*, nous avons obtenu les types B. A. O. R., Beccles, Taunton et probablement Dundee. A partir du type lysogène B. A. O. R., nous avons obtenu des résultats analogues au schéma du groupe Z, tel du moins que nous l'observons avec les phages types actuellement à notre disposition. Nous ne pouvons pas dire si ce type artificiel est identique au type obtenu à partir du type 3 *b* (1).

Donc, pour obtenir artificiellement toute la série des types lysogènes, il a été nécessaire de prendre comme type de base, à tour de rôle, les 3 types 1, 3 *a* et 3 *b* non lysogènes (tableau V). Chacun de ces types n'a pu donner, par l'action des phages de lysogénéité, que certains types : le type 1 n'a permis d'obtenir que le type 2; le type 3 *a*, que les types 3 *a* (moins 3 *b*) et 3 *a* 1; le type 3 *b*, que les types B. A. O. R., Beccles, Taunton et Dundee. Dans la mesure où nous avons le droit d'assimiler les types artificiels aux types naturels, nous pouvons distinguer, parmi les types de *S. paratyphi* B, trois familles constituées, chacune, par un type de base et un ou plusieurs types lysogènes. Remarquons que ces constatations concordent, dans leur ensemble, avec l'ordre que Felix et Callow ont attribué à leurs types dans le schéma provisoire de 1949 (non publié, communication personnelle).

Les types 1, 3 *a*, 3 *b* sont donc bien différents les uns des autres, comme, du reste, ils sont différents dans leur gamme de sensibilité aux phages Vi de la lysotypie.

2° Les tableaux I, II, III et IV montrent la proche parenté des divers bactériophages extraits des types 3 *a* (moins 3 *b*), 3 *a* 1

(1) Nous ne savons pas, en effet, si le phage de lysogénéité du type B. A. O. R. est identique ou non au phage secondaire, difficilement isolable, du type Dundee. Remarquons d'ailleurs que le phage primaire extrait du type Taunton donne, par son action sur le type B. A. O. R., également un schéma analogue à celui du groupe Z. Mais il nous semble illogique de rapprocher ce type artificiel du groupe Z naturel.

TABLEAU V.

TYPES DE BASE	ACTION des phages déterminants extraits des types suivants	TYPES ARTIFICIELS obtenus
Type 1.	Phage unique du type 2.	Type 3.
Type 3a.	Phage unique du type 3a (moins 3b). Phage primaire du type 3a1 (commun aux deux groupes B. 1305 et B. 624).	Type 3a (moins 3b). Type 3a1.
Type 3b.	Phage unique du type B. A. O. R. Phage primaire du type Beccles. Phage primaire et phage secondaire du type Taun- ton. Phage primaire et phage secondaire du type Dundee.	Type B. A. O. R. Type Beccles. Type Taunton. Type Dundee.
Type lysogène B. A. O. R.	Phage primaire du type Dundee.	Groupe Z (?).

(phage primaire), Beccles (phage primaire), Taunton (phage primaire) et Dundee (phage primaire). La sérologie et l'étude de la gamme d'activité nous avaient déjà indiqué cette parenté. Remarquons, par exemple, que ces différents phages agissant sur le type 3 b le transforment, tous, en un type analogue au type Beccles. Cependant, ils ne sont pas identiques : lorsqu'on les fait agir sur le type 1, les cultures obtenues fournissent 3 schémas atypiques différents : le phage extrait de 3 a (moins 3 b) éteint la sensibilité du type 1 aux phages Vi, 3 a 1 et 3 b, le phage extrait des types 3 a 1 et Beccles et Dundee, rendent le type 1 résistant aux phages Vi, 3 b et Beccles et le phage primaire extrait du type Taunton supprime les réactions aux phages Vi 3 a, 3 a 1, 3 b, Beccles et Taunton.

Enfin, les mêmes phages de lysogénité, agissant sur le type 3 a, confèrent à ce type une résistance aux phages Vi 1, 2 et 3 b, c'est-à-dire un schéma analogue à celui du type 3 a 1. Toutefois, le phage extrait du type Beccles n'éteint que la réaction au phage Vi 3 b (schéma atypique).

Cette différence dans le comportement de leurs cultures secondaires donne à chacun des phages de lysogénité une certaine individualité. Les mêmes tableaux font ressortir l'autonomie complète des phages extraits des types 2 et B. A. O. R.

3° Les tableaux montrent que la présence de deux bactériophages est nécessaire pour déterminer l'appartenance aux types Taunton et Dundee : le phage primaire, extrait de l'un ou l'autre de ces types, si on le fait agir sur le type 3 *b*, le change en type Beccles, alors que l'action conjuguée des phages primaires et secondaires, extraits de ces types, transforment le type 3 *b* respectivement en type Taunton et Dundee. Au contraire, du type 3 *a* 1 (groupe B. 624), on a pu extraire deux phages. Seul le phage primaire provoque la transformation du type 3 *a* en type 3 *a* 1. Le phage secondaire ne paraît pas jouer un rôle dans cette transformation. Il y a donc, chez les types lysogènes, deux catégories de phages : les phages qui commandent l'appartenance au type (*phages déterminants*) et les phages dénués d'influence sous ce rapport (*phages indifférents*). Ces phages indifférents se comportent donc comme certains phages de contamination qui n'altèrent pas le type.

STABILITÉ. — Les types transformés artificiellement peuvent, en général, subir de nombreux repiquages (plus de 30) sans modification.

Dans de rares exceptions, cependant, après une dizaine de repiquages, on a constaté un fléchissement de la lysogénéité acquise, accompagnée d'une diminution de la résistance aux phages Vi.

L'action du formol, signalée plus haut, accélère parfois ce retour à la sensibilité : une culture du type artificiel 3 *a* 1, obtenu par l'action du phage extrait du type 3 *a* 1 sur le type 3 *a*, traitée par le formol, a redonné les réactions du type 3 *a*.

Des cultures du type B. A. O. R. naturel, transformées en groupe Z par le phage primaire extrait du type Dundee, ont redonné, après formolisation, le type B. A. O. R. initial. Remarquons que le type B. A. O. R. est lysogène et que le formol n'a altéré ni sa lysogénéité naturelle, ni sa gamme de sensibilité aux phages Vi, alors que le groupe Z artificiel obtenu à partir du type B. A. O. R. n'a pas résisté à l'action inhibitrice de cet antiseptique.

Les types obtenus artificiellement ne présentent donc pas la stabilité remarquable des types naturels.

Lorsque des cultures, destinées à la lysotypie, se trouvent sous une forme dégradée (souches déficientes en antigène Vi, forme R, etc.), la méthode de Felix et Callow n'est généralement d'aucun secours. On peut concevoir que les types de ces cultures puissent être cependant indirectement identifiés par l'étude de leurs phages de lysogénéité, en admettant naturellement qu'une culture ayant subi la transformation S \rightarrow R conserve intact son matériel de lysogénéité.

L'étude de la lysogénéité peut également aider à différencier des types encore inconnus. A l'appui de cette affirmation, rappelons que nous avons pu individualiser le type 3 b (moins Beccles et Taunton) avant que son identité avec le type B. A. O. R. nous eut été confirmée par Felix et Callow.

DISCUSSION.

Le rôle de la lysogénéité dans la diminution de la sensibilité aux bactériophages utilisés pour la lysotypie de *S. typhi* a été entrevue par Craigie (1942, 1946) :

« Some untypable Vi strains carry a potential lytic agent or bacteriophage termed « gamma agent » by Craigie (1942) [4]. The resistance of these strains to Vi phage II appears to be a phenomenon analogous to the interference effect known to occur between certain plant or mammalian viruses (Craigie, 1946) [5].

Cet auteur cite à ce sujet les exemples suivants : 1° l'agent gamma, extrait d'un type D de *S. typhi*, rend résistantes aux phages Vi spécifiques les cultures Vi des types A et E 1 ; 2° l'agent gamma, provenant d'une souche D 1, pouvait servir à transformer le type E en type D 1. Craigie estime cependant qu'un tel changement de type, facilement obtenu *in vitro*, ne doit pas se produire avec quelque fréquence au cours des épidémies de fièvre typhoïde.

Williams Smith (1948) [6], étudiant le rôle éventuel de la lysogénéité dans la subdivision excessive des staphylocoques par la méthode de Wilson et Atkinson (1945) [7], confirme les observations de ces auteurs et conclut que les différences apparentes entre ces staphylocoques peuvent être dues, en fait, à une phago-résistance acquise. « Since a considerable proportion of strains are lysogenic and hence resistant, it is clear that the classification of staphylococci by phage methods is dependent to a considerable extent, on the past experience of the organisms, with regard to phage infection. For example, two strains that are identical apart from the fact that one of them has acquired a resistance to a phage may be classified as two different phage types ».

Contre cette manière de voir, Rountree, 1949 [8], affirme que les phages de lysogénéité sont sérologiquement différents des phages employés pour la lysotypie des staphylocoques, et elle conclut que les différences de sensibilité des staphylocoques aux phages spécifiques des types ne doivent pas être rapportées en premier lieu à la lysogénéité, mais à des facteurs encore inexpliqués.

Dans l'espèce *S. paratyphi* B, Nicolle, Grabar et Gibert,

1946 [9] ont trouvé 22 souches lysogènes sur 31 souches examinées. Vingt souches portaient un phage sérologiquement identique, le phage 1 et les deux autres un phage différent, le phage 2.

Les souches considérées à ce moment-là comme non lysogènes étaient sensibles à ces deux phages. Les souches porteuses du phage 1 étaient sensibles au second, mais résistantes au premier et inversement. La lysogénéité et la lysosensibilité ne sont donc deux états incompatibles dans les conditions habituelles que lorsqu'on les envisage par rapport à un même bactériophage.

D'autre part, la majorité des bactériophages utilisés pour la lysotypie de *S. paratyphi* B ont été obtenus à partir de cultures lysogènes de cette espèce (Felix et Callow, 1943) [10]. Il était logique de penser que certains de ces phages de lysogénéité, contrairement à ce que Rountree a constaté dans les cas des staphylocoques, devaient être sérologiquement identiques ou plus ou moins apparentés aux autres phages portés par les cultures lysogènes. Il nous a paru alors évident que la lysogénéité des cultures de *S. paratyphi* B, plus variée et plus fréquente que nous n'avions été en mesure de le montrer dans l'étude limitée que nous avons faite en 1946, devait jouer un rôle de premier plan dans l'appartenance de cette espèce aux différents types de Felix et Callow.

Nos expériences de reconstitution artificielle des types lysogènes par l'action des phages de lysogénéité sur les types considérés comme non lysogènes constituent la contre-épreuve de l'étude analytique des souches naturelles que nous avons rapportée dans notre premier mémoire.

La lysogénéité explique donc dans une certaine mesure les différences observées, chez les divers types lysogènes, dans leur gamme de sensibilité aux phages de la lysotypie. Elle n'explique pas cependant pourquoi chaque type lysogène ne peut être artificiellement obtenu qu'à partir de l'un des trois types de base à l'exclusion des deux autres. Elle n'apporte aucun éclaircissement au problème des lysosensibilités distinctes constatées chez ces 3 types.

Quels sont donc les facteurs qui impriment leur individualité à ces 3 types de base ?

Ne seraient-ils pas, du moins l'un ou l'autre d'entre eux, porteurs d'un phage inactif sur l'espèce paratyphique B, mais actif sur d'autres *Salmonella* ? A ce sujet, il faut rappeler que Scholtens [11] a trouvé chez le type 1 un phage actif sur *S. dublin* n° 65. Ou bien, n'aurait-on pas affaire ici à un cas de « cryptolysogénéité » semblable à ceux qui ont été signalés par Lominski, 1938 [12], ou encore à des facteurs purement bactériens, physiologiques, antigéniques ou biochimiques, ou purement bactériophagiques, d'ordre mutationnel ?

RÉSUMÉ.

Les 7 types lysogènes de *S. paratyphi* B ont pu être préparés artificiellement, à partir de l'un ou l'autre des 3 types admis provisoirement comme non lysogènes, à l'exclusion des 2 autres, par contamination avec les phages extraits des types lysogènes. Chacun de ces 3 types apparaît donc comme le chef de file d'une famille de types. La lysogénéité, dans ses divers états, explique partiellement les différences de la lysosensibilité présentée par les divers types vis-à-vis des phages utilisés pour la lysotypie.

Cependant, elle n'explique pas l'existence des 3 types de base, ni le groupement des types lysogènes en 3 familles ayant chacune un type de base différent. Il faut bien admettre, indépendamment de la présence possible d'un phage actif hors de l'espèce, ou d'un phage de cryptolysogénéité, l'existence d'un ou de plusieurs facteurs purement bactériens (2).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. NICOLLE, Y. HAMON et E. EDLINGER. *Ces Annales*, 1951, **80**, 000.
- [2] P. NICOLLE, A. JUDE et R. BUTTIAUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 246.
- [3] P. NICOLLE. *Ces Annales*, 1947, **73**, 705.
- [4] J. CRAIGIE. *Canad. Publ. Health. J.*, 1942, **33**, 41.
- [5] J. CRAIGIE. *Bact. Rev.*, 1946, **10**, 73. a
- [6] H. WILLIAMS SMITH. *J. Hyg.*, 1948, **46**, 82.
- [7] G. S. WILSON et J. D. ATKINSON. *Lancet*, 1945, **1**, 647.
- [8] P. M. ROUNTREE. *J. Gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 153.
- [9] P. NICOLLE, J. GRABAR et P. GIBERT. *Ces Annales*, 1946, **72**, 81.
- [10] A. FELIX et B. R. CALLOW. *Brit. Med. J.*, 1943, **2**, 127.
- [11] R. Th. SCHOLTENS. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1950, **16**, 256.
- [12] I. LOMINSKI. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 151 et 264.

(2) Nous remercions M. Paul Ducrest et M^{me} Diverneau de l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée dans l'exécution technique de ce travail et du précédent.

INFLUENCE DU STOCKAGE SUR LA VITALITÉ DU VACCIN BCG

par KONRAD BIRKHAUG (*).

*(Laboratoire du BCG au Service de Santé
de l'Etat de New-York, à Albany.)*

On admet généralement que le pouvoir antigène du BCG dépend du nombre de germes viables que contient le vaccin, de leur multiplication et de leur dissémination dans l'organisme du sujet vacciné. Nous avons déjà eu l'occasion de constater que pour trouver le plus grand nombre de germes vivants (ou d'agglomérats de germes vivants), il faut s'adresser à des cultures de BCG sur milieu de Sauton âgées de 7 à 11 jours ; les cultures de cet âge contiennent, en effet, au moins deux fois plus de bacilles vivants que les cultures sur le même milieu âgées de 20 à 30 jours, employées pour la préparation du vaccin d'après la technique de Calmette. Les recherches concernant le nombre de germes vivants dans le vaccin BCG sont rares et leurs résultats sont contradictoires. Ainsi Aronson constate que « la vitalité des germes contenus dans le vaccin BCG diminue rapidement après cinq à sept jours et continue de diminuer ensuite, comme on peut s'en rendre compte par des ensemencements, par le pouvoir tuberculeux du vaccin et par la consommation d'oxygène de ce même vaccin ». Dubos et Fenner ont cultivé du BCG en profondeur dans un liquide contenant du Tween 80 et une fraction soluble de sérum humain chauffé. Des cultures de ce genre produisent, entre leurs mains, quand elles sont âgées de 8 jours et ont été maintenues ensuite pendant six semaines à la glacière, 36×10^6 colonies par centimètre cube de culture.

Nous avons, depuis septembre 1946, dans notre service, employé une méthode de culture standardisée pour la production hebdomadaire de lots de vaccin BCG en utilisant des cultures sur milieu de Sauton âgées de 10 à 11 jours. Jusqu'à présent 204 lots consécutifs de vaccin fraîchement préparé ont été ensemencés pour contrôler le nombre de germes vivants et, en outre, le même contrôle a été effectué avec des vaccins gardés à la glacière (2° à 1°) jusqu'à 3 ans 1/2. Nous voudrions, aujourd'hui, décrire

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} février 1951.

l'influence de ce stockage du vaccin sur la vitalité des germes qu'il contient.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES. — Les 60 premiers lots hebdomadaires consécutifs de vaccin ont été préparés chacun en partant d'environ 6 à 10 g de culture BCG (poids après essorage). Les masses de culture furent homogénéisées par rotation dans des flacons contenant 1 kg de billes en acier inoxydable de 4 mm de diamètre et 0,500 kg de billes de 3 mm de diamètre ; la rotation était faite à la main à environ 30 rotations par minute. Après trois minutes de rotation, la masse de culture était transformée en une pâte huileuse adhérente aux parois du cylindre et aux billes métalliques. Après avoir ajouté 10 cm³ de liquide de suspension (une partie de Sauton et trois parties d'eau physiologique), on continuait la rotation pendant trois minutes environ ; on ajoutait enfin la quantité de liquide nécessaire pour obtenir une suspension de BCG dosée à 20 mg par centimètre cube et on continuait encore la rotation pendant cinq minutes. La suspension contenant 20 mg de BCG par centimètre cube est utilisée pour la vaccination transcutanée de l'homme. Des frottis préparés avec cette suspension révèlent des bacilles acido-résistants minces et granuleux répandus parmi des agglomérats plus ou moins grands, dont certains contiennent plusieurs centaines de germes. Sur ces frottis nous avons trouvé très peu de bacilles fragmentés ou non acido-résistants. Les 144 derniers lots hebdomadaires consécutifs de vaccin proviennent chacun d'environ 20 mg de culture de BCG et furent broyés avec 1,500 kg de billes métalliques de 4 mm de diamètre et 1,500 kg de billes de 3 mm de diamètre. Le broyage eut lieu cette fois non plus à la main, mais à l'aide d'un moteur électrique permettant 60 rotations par minute. Ayant remarqué que la glycérine possède une légère activité bactéricide sur le BCG, nous avons modifié la composition du milieu liquide de suspension en choisissant une part de Sauton sans glycérine et trois parts de solution tampon phosphatée à pH 7,2 qui a donné, au cours de nombreux tests, des résultats satisfaisants. Le temps de broyage lui-même a été légèrement prolongé en ce sens que nous avons commencé par cinq minutes de rotation de la masse de culture, cinq minutes après avoir ajouté du liquide, juste de quoi couvrir les billes métalliques et finalement dix minutes après avoir ajouté la quantité de liquide suffisante pour obtenir la concentration de 20 mg de BCG par centimètre cube. Les frottis de cette suspension nous ont montré la même distribution irrégulière de bacilles acido-résistants et granulaires individuels répartis entre des amas plus ou moins volumineux, dont certains contiennent plusieurs centaines de bacilles. La prolongation du broyage n'a pas produit un plus grand nombre de

bacilles fragmentés ou non acido-résistants que les broyages précédents moins prolongés. Il est évident que le nombre de colonies, produit par l'ensemencement de ces suspensions de BCG contenant des amas, ne correspond pas au nombre exact de germes viables, présents dans chaque lot de vaccin, mais représente plutôt la dispersion moyenne d'amas de BCG qui se trouvent dans le vaccin frais ou stocké à la glacière.

VITALITÉ DU VACCIN FRAÎCHEMENT PRÉPARÉ. — Pour déterminer le nombre d'amas de BCG vivants présents dans chaque lot hebdomadaire de vaccin fraîchement préparé, le vaccin fut d'abord dilué dans de l'eau physiologique de façon à contenir 1 mg de BCG par centimètre cube, et ensuite dilué chaque fois dix fois pour obtenir finalement des dilutions au 1/100 000, 1/1 000 000 et 1/10 000 000, puis 1 cm³ de chacune de ces dilutions fut ensemencé sur 5 grands tubes de milieu à l'œuf de Löwenstein (0,2 cm³ par tube). Les tubes furent placés en position horizontale à l'étuve à 37°5 pendant environ cinq heures pour permettre à l'excès de liquide de s'évaporer presque complètement; les tubes étaient

TABLEAU I. — **Vitalité du vaccin BCG fraîchement préparé en partant de cultures sur Sauton âgées de 10 à 11 jours.**

Analyse statistique du nombre de colonies qui se sont développées sur milieu de Löwenstein ensemencé avec la dilution au 1/1 000 000, dans l'eau physiologique, d'une suspension de BCG dosée à 1 mg par centimètre cube. (120 cultures dans chaque groupe.)

LOTS HEBDOMADAIRES de vaccin BCG	NOMBRE de colonies	PROBABILITE	
		<i>t</i>	<i>P</i>
1 ^{re} à 12 ^e semaine	45 ± 5,39 (1)		
13 ^e à 24 ^e semaine	44 ± 6,25	0,462	0,87
25 ^e à 36 ^e semaine	52 ± 11,49	1,715	0,10
37 ^e à 48 ^e semaine	47 ± 7,49	0,735	0,47
49 ^e à 60 ^e semaine	44 ± 12,09	0,245	0,82
61 ^e à 72 ^e semaine	46 ± 9,39	0,294	0,77
73 ^e à 84 ^e semaine	38 ± 7,00	2,450	0,03
85 ^e à 96 ^e semaine	47 ± 8,78	0,612	0,55
97 ^e à 108 ^e semaine	37 ± 6,33	2,695	0,02
109 ^e à 120 ^e semaine	38 ± 6,32	2,694	0,02
121 ^e à 132 ^e semaine	48 ± 8,71	0,906	0,38
133 ^e à 144 ^e semaine	43 ± 3,88	0,808	0,42
145 ^e à 156 ^e semaine	63 ± 24,40	2,205	0,03
157 ^e à 168 ^e semaine	42 ± 8,25	0,612	0,55
169 ^e à 180 ^e semaine	61 ± 23,20	2,180	0,04
181 ^e à 192 ^e semaine	68 ± 21,03	3,330	< 0,01
193 ^e à 204 ^e semaine	57 ± 9,17	2,709	0,02

(1) Déviation moyenne : ± standard de la moyenne ; Forte déviation en allongées.

alors bouchés au caoutchouc et placés la face en bas. Les colonies furent dénombrées après quatre à huit semaines d'incubation à 37°5.

Le tableau I représente le nombre de colonies de BCG produit dans 5 tubes pour chaque dilution au 1/1 000 000 en série double. Pour l'analyse statistique, 12 dénombrements de colonies hebdomadaires sont réunis en un groupe comprenant au total 120 cultures individuelles de la dilution au 1/1 000 000. On voit que la variation moyenne s'étend entre $37 \pm 6,33$ à $68 \pm 21,03$ colonies, avec une moyenne de $48 \pm 10,55$ colonies pour le groupe entier des 204 lots hebdomadaires de vaccin. Il s'ensuit que des vaccins fraîchement préparés d'après les méthodes de culture et de récolte standard, et en utilisant des cultures âgées de 10 à 11 jours, contiennent une population de germes BCG vivants ou d'amas de germes plus ou moins stable.

VITALITÉ DU VACCIN BCG STOCKÉ A 2 A 4°. — Aronson a examiné les effets du stockage sur la viabilité des suspensions de BCG dosées à 1 mg par centimètre cube dans du Sauton dilué au 1/3 ou dans une solution tampon phosphatée à pH 7,2, en recherchant le taux minima du vaccin produisant encore un développement dans le milieu de Dubos contenant du Tween 80 et une fraction soluble de sérum humain chauffé. Les résultats obtenus par Aronson furent à peu près les mêmes pour les deux liquides de suspension : développement d'une dilution au 1/1 000 000 quand il s'agissait de vaccin âgé de 3 jours, d'une dilution au 1/100 dans le cas de vaccin âgé de 6 à 12 jours, de la dilution au 1/10 pour du vaccin âgé de 22 jours et plus de développement du tout quand le vaccin était âgé de 25 jours et était suspendu dans du Sauton dilué, et, au même âge, développement de la dilution au 1/10 quand le vaccin avait été suspendu dans la solution tampon phosphatée et avait été stocké soit à 4° soit à 20°.

Nous suivons dans notre service une règle, qui veut qu'une ampoule de 12 cm³ de chaque lot de vaccin BCG dosé à 20 mg par centimètre cube, et une de vaccin dosé à 1 mg par centimètre cube, soient gardées indéfiniment à la glacière à 2 à 4°. Des ampoules de vaccin, ainsi stockées pour une durée allant jusqu'à trois ans et demi, furent vigoureusement secouées à la main pendant dix minutes et des ensemencements de dilutions progressives, préparées comme nous l'avons exposé plus haut, furent effectués dans le milieu de Dubos et sur milieu de Löwenstein (1 cm³ et 0,2 cm³ respectivement de la solution au 1/1 000 000). Les cultures furent examinées simultanément après quatre à huit semaines d'incubation, les cultures dans le Dubos par examen microscopique et par repiquage, les cultures sur Löwenstein par le dénombrement des colonies. Le tableau II montre les résultats

de ces examens. On voit que le milieu de Löwenstein donne un nombre de résultats positifs plus élevé que le milieu de Dubos. Celui-ci nécessite probablement un nombre de germes vivants plus élevé pour permettre le développement de la culture en profondeur, que le milieu de Löwenstein pour la culture en surface. Il est également évident, quand on se place dans les conditions expérimentales adoptées par nous, que la perte en germes viables ou en amas viables, dans du vaccin stocké à 2 à 4°, est très inférieure à celle constatée par Aronson. En effet, à peu près 50 p. 100 de bacilles BCG vivants se trouvent encore dans du vaccin âgé de 3 semaines, 2 p. 100 dans du vaccin âgé d'un an. Nous sommes actuellement occupé à déterminer le pouvoir tuberculo-gène de vaccin stocké, contenant des germes BCG vivants et morts.

TABLEAU II. — Vitalité du vaccin BCG stocké à 2 à 4° jusqu'à 3 ans.

VACCIN Lot n°	DURÉE du stockage	DÉNOMBREMENT des colonies par cm ³ de dilution de suspensions dosées à 1 mg de BCG par cm ³	POURCENTAGE du taux de survie	DÉVELOPPEMENT du vaccin BCG dilué en milieu de Dubos (frottis)
A-90	Frais.	49×10^6		10 - 7
A-90	1 jour.	45×10^6	92	10 - 7
A-90	2 jours.	41×10^6	84	10 - 7
A-90	3 jours.	46×10^6	92	10 - 7
A-90	4 jours.	37×10^6	76	10 - 6
A-90	5 jours.	41×10^6	84	10 - 7
A-90	6 jours.	40×10^6	82	10 - 6
A-90	7 jours.	38×10^6	78	10 - 6
A-90	2 semaines.	26×10^6	53	10 - 5
A-90	3 semaines.	24×10^6	49	10 - 5
A-90	4 semaines.	19×10^6	39	10 - 5
B-90	6 semaines.	15×10^6	31	10 - 5
A-87	3 mois.	9×10^6	18	10 - 5
A-81	6 mois.	6×10^6	12	10 - 5
A-75	9 mois.	12×10^5	2,5	10 - 4
A-68	1 an.	9×10^5	1,8	10 - 4
A-41	2 ans.	4×10^2	0,0008	10 - 1
A-15	3 ans.	0		0
A-2	3 ans 1/2.	0		0

RÉSUMÉ. — Du vaccin BCG, produit d'après les méthodes de culture et de récolte standardisées en utilisant des cultures sur Sauton âgées de 10 à 11 jours, contient approximativement 50 000 000 de germes vivants ou d'amas de germes vivants par milligramme de culture essorée. La perte en germes vivants ou en amas vivants, dans du vaccin suspendu dans un liquide sans

glycérine et stocké à la température de 2 à 4°, n'est pas rapide mais augmente graduellement avec l'âge, comme le montrent les ensemencements.

BIBLIOGRAPHIE

- J. D. ARONSON. *Am. J. Publ. Health*, 1950, **40**, 533.
K. BIRKHAUG. *Am. Rev. Tub.*, 1949, **59**, 567.
A. CALMETTE. *L'infection bacillaire et la Tuberculose*. Masson et C^{ie}.
Paris, 1936, p. 912.
R. J. DUBOS et F. FENNER. *J. Exp. Med.*, 1950, **91**, 261.
R. A. FISHER et F. YATES. *Statistical tables for Biological, Agricultural
and Medical Research*, Londres, Oliver and Boyd, 1938, p. 26.

ÉTUDE CYTOLOGIQUE DE *ENDOSPORUS FILAMENTOSUS*

(POCHON ET CHALVIGNAC 1950)

par J. POCHON et M^{lle} M.-A. CHALVIGNAC.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Microbie technique.)

Nous avons isolé et décrit une espèce bactérienne aérobie nouvelle, isolée du sol : *Endosporus filamentosus* (1). Cette bactérie présente un polymorphisme accentué avec formes bacillaires courtes et formes longues, filamenteuses, les unes et les autres pouvant évoluer vers l'autolyse. Les germes sporulés sont rares et apparaissent tardivement dans les cultures.

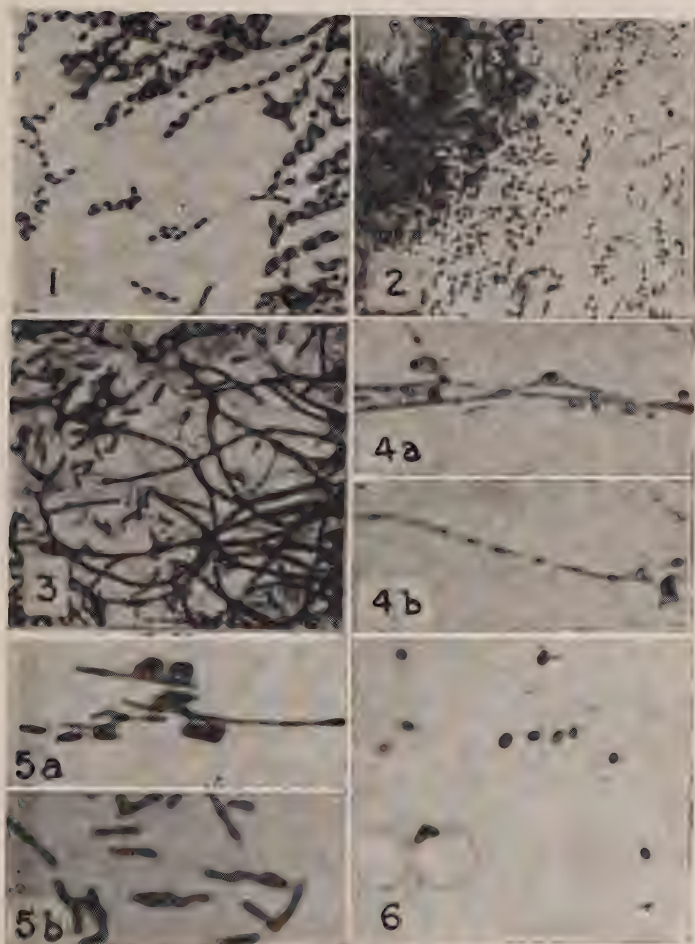
Ces caractères particuliers nous ont incités à faire son étude cytologique détaillée.

Dans ce but, les cultures ont été réalisées sur plaques de gélose-amidon et des prélèvements faits par apposition sur lame aux intervalles suivants : 10, 20, 30, 40 et 50 minutes, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 16, 20, 24, 36, 40, 60 heures, 5, 7 jours. Les lames ont été fixées aux vapeurs osmiques ; les préparations, après hydrolyse chlorhydrique, ont été colorées au Giemsa (technique de Robinow).

Jusqu'à la quarantième heure l'interprétation des examens est relativement facile : la multiplication se fait selon le schéma classique. Stades à 2, 4, 8 noyaux. Le retard de la division cellulaire sur la division nucléaire peut être considérable puisque l'on trouve des formes à 14 noyaux, toujours groupés par paire (fig. 1). A tous ces stades l'évolution peut se faire vers l'autolyse : le germe devient peu colorable, les granules chromatiques sont irrégulièrement répartis, deviennent très petits, véritable poussière dans une ombre de microbe. Cet aspect est surtout manifeste au centre des colonies, où les germes, tassés les uns contre les autres, sont très grêles, ont un cytoplasme à peine visible, si bien que l'on ne voit guère qu'un amas de granules d'abord colorés en bleu intense, puis de plus en plus pâles pour ne plus réaliser qu'un nuage bleuâtre (fig. 2).

Vers la quarante-cinquième heure apparaissent les formes filamenteuses (fig. 3), extrêmement longues, traversant un champ microscopique entier. Les unes ont une structure nucléaire

absolument normale et à grains nettement individualisés et groupés par paire; les autres, évoluant vers l'autolyse, sont mal colorées; les granules sont irrégulièrement répartis; lorsque l'autolyse est complète, on ne note plus qu'un filament rose pâle,



avec une poussière chromatique ou même sans chromatine (fig. 4 a et 4 b).

C'est également vers la quarante-cinquième heure que l'on peut noter des proliférations secondaires, à la périphérie des colonies, caractérisées par des germes plus volumineux, à protoplasme intensément coloré en rose, à noyau peu visible, souvent en

bâtonnet. On suit très bien cette transformation en déplaçant la préparation depuis le centre jusqu'à la périphérie de la colonie (fig. 5 a et 5 b).

Enfin, peuvent apparaître assez précocement, vers la troisième heure, des formes assez longues, à un seul noyau central qui nous semble devoir être interprété comme un stade de condensation, de réorganisation, plutôt que comme un stade banal à un noyau au cours des phénomènes normaux de division (stade que nous avons observé dans des cellules courtes). Ce noyau central se divise en deux, avec pont chromatique, chacun des deux noyaux migrant progressivement aux extrémités de la cellule. Des formes assez longues à 3 noyaux (un central et deux polaires) ont été observées sans que nous en puissions donner d'interprétation satisfaisante.

Il ne nous a malheureusement pas été possible de mettre en évidence, sur ce milieu et dans ces conditions, d'images de sporulation. Cependant, deux ou trois cellules, insuffisantes pour pouvoir donner une description précise, laissent supposer que la spore se forme autour d'un grain chromatique avec élimination des autres grains de la cellule végétative.

Par contre, en prélevant des colonies anciennes (deux mois) sur silico-gel, après fixation à l'alcool-formol, inclusion à la paraffine et coupe au microtome, nous avons trouvé, noyées dans le mucus, de très nombreuses spores ovalaires, mais toute image de formes végétatives avait disparu aussi bien à la périphérie, qu'au centre de la colonie (fig. 6).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) J. POCHON et M^{lle} M. A. CHALVIGNAC. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 123.

REMARQUES SUR LES RECHERCHES RELATIVES A L'ACTION DE CERTAINES SUBSTANCES ANTIPARASITAIRES SUR LA MICROFLORE DU SOL

par J. POCHON, M^{me} J. LAJUDIE et M^{lle} O. COPPIER.

(Institut Pasteur. Laboratoire de Microbie technique.)

Depuis l'utilisation, en agriculture, de substances nématocides, insecticides et fongicides, des recherches ont été consacrées à l'action de ces corps sur la microflore du sol ; une action antiseptique sur les bactéries ne pouvait être éliminée *a priori*, qui eut été préjudiciable à l'équilibre biologique des sols traités.

Nous avons, en 1948 [1], étudié l'action de l'hexachlorocyclohexane (mélange des isomères), du dichloropropane-dichloropropylène et du bromure d'éthylène et avons conclu, après des expériences en pots sur deux lots de terre, à l'innocuité de ces corps sur la microflore et même à leur action stimulante sur certains groupements physiologiques (*Azotobacter*, ferments nitreux). Les quelques travaux publiés depuis aboutissent sensiblement aux mêmes conclusions.

Nous avons repris cette étude, sur une plus grande échelle, sur deux types de terres betteravières provenant de Belgique (1) ayant reçu, en différentes parcelles, les traitements suivants : D. D., 800 kg à l'ha-D. D., 400 kg à l'ha-D. D., 800 kg à l'ha, associé à H. C. H., 0,700 kg à l'ha-H. C. H., 0,700 kg à l'ha-phossol (à 2 p. 100 de thiophosphate de diéthyle et paranitrophényle), 500 kg à l'ha, associé à H. C. H., 0,700 kg à l'ha-pentachlorophénol, 333 l à l'ha. De plus, pour chacun de ces types de terre, une parcelle était laissée sans traitement, comme témoin.

Pour chaque parcelle nous avons recherché :

1° La richesse en bactéries appartenant aux groupes physiologiques suivants :

a) *Azotobacter* : technique de Winogradsky ; pourcentage de grains de terre donnant une culture sur plaque de silico-gel au pyruvate de sodium.

(1) Ces terres nous ont été fournies par l'Institut Belge pour l'Amélioration de la betterave, que nous tenons à remercier ici.

b) *B. cellulolytiques* aérobies : technique de Winogradsky ; pourcentage de grains de terre donnant une culture sur plaque de silico-gel recouvert d'une feuille de papier-filtre.

c) *B. nitrificatrices* : technique de Winogradsky ; pourcentage de grains de terre donnant une culture sur plaques de silico-gel aux sels d'ammonium ou aux nitrites.

2° La richesse de la microflore totale :

a) Par microscopie directe (technique de Jones et Mollison).

b) Par ensemencements, après dilution, sur plaques de gélose à l'extrait de terre.

Les résultats de ces expériences, qui représentent un nombre considérable de numérations (toutes ont été faites en triple et chacune d'elles sur trois séries de plaques), sont décevants, mais méritent cependant d'être signalés car ils montrent la complexité du problème.

Tout d'abord ils mettent bien en évidence l'irrégularité des techniques de numération (tous les auteurs sont d'ailleurs d'accord sur ce point) vraisemblablement en rapport avec l'hétérogénéité de la terre, quelles que soient les précautions prises. Ces irrégularités se voient aussi bien dans les numérations par culture que dans celles par microscopie directe. Avec cette dernière technique sont comptés aussi bien les germes morts que les germes vivants, mais il n'y a aucun rapport constant entre les chiffres fournis par les deux méthodes de numération (fait déjà signalé par Gray et Thornton [2]).

Par ailleurs, dès que l'on quitte les expériences en pots ou en terres laissées en jachère, pour travailler sur des terres en culture, les interférences de facteurs innombrables interviennent qui rendent l'interprétation des résultats aléatoire.

Il nous semble inutile de donner le détail de nos résultats, mais seulement les moyennes obtenues (voir tableau).

Ces résultats semblent indiquer que les différentes substances utilisées ont pratiquement la même action sur la microflore, qu'il s'agisse des divers groupements physiologiques (fixateur, cellulolytique, nitrificateur) ou de la microflore totale. Cette action varie suivant le type de terre.

Pour la terre A (N total = 1,3 p. 100, C = 14 p. 100, C/N = 10) cette action est nulle. Pour la terre B (N total = 1,12 p. 100, C = 19 p. 100, C/N = 17) cette action est plutôt dépressive en ce qui concerne les mêmes groupements physiologiques, alors qu'elle est faible ou nulle sur la microflore totale.

On peut noter, ce qui est d'ailleurs classique, que la numération sur plaques, qui ne compte que les germes vivants, donne toujours des chiffres inférieurs à ceux fournis par la numération directe, qui donne les germes vivants et morts. Une très grande différence entre les deux chiffres indiquerait une action toxique

ÉCHANTILLON	NATURE DU TRAITEMENT	AZOTOBACTER p. 100	CELLULOLYTIQUES p. 100	NITRIFICATEURS p. 100	MOYENNE p. 100	NUMÉRATION sur plaque par g	NUMÉRATION directe par g
<i>Terre A :</i>							
Témoin A .		41	38	64	37	1 400 000 000	6 400 000 000
1.	D. D. 800 kg par ha + γ H. C. H. 0,7 kg par ha.	25	45	41	37	3 000 000 000	7 400 000 000
2.	γ H. C. H. 0,7 kg par ha.	45	30	78	41	1 400 000 000	4 400 000 000
3.	Phossol. 500 kg par ha + γ H. C. H. 0,7 kg par ha.	43	41	63	33	875 000 000	5 000 000 000
<i>Terre B :</i>							
Témoin B .		10	47	38	31	2 200 000 000	6 500 000 000
4.	Shell D. D. 800 kg par ha.	0	30	8	13	1 600 000 000	2 100 000 000
5.	Pentachlorophénol. 333 litres par ha.	4	41	67	37	2 250 000 000	3 700 000 000
6.	Shell D. D. 400 kg par ha.	3	52	27	27	2 700 000 000	6 000 000 000
Terre A : provient de Ezmael-les-Tirlemont. Terre B ; provient du Jardin d'essais de l'Institut à Tirlemont. Les quatre premières colonnes indiquent la proportion sur cent de grains de terre donnant une culture.							

énergique ; c'est le cas, dans nos expériences, du lot 3, traité au phossol.

Mais il nous paraît surtout utile d'insister sur le caractère comparatif de ces essais, et donc sur la nécessité d'opérer toujours en présence de témoins rigoureux, les mêmes parcelles, pour chaque terre, recevant le même traitement. Il n'en est pas moins vrai que l'agrobiologiste est encore mal armé, au point de vue technique, pour l'étude quantitative des processus biologiques au sein du sol.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Ann. Agronomiques*, 1948, n° 4.
 [2] THORNTON et GRAY. *Proceed. Roy. Soc. London*. S. B. 1934, **115**, 522.

RECHERCHES SUR LE TACTISME LEUCOCYTAIRE. EFFET REMARQUABLE DE L'HUILE D'OLIVES

par A. DELAUNAY, JACQUELINE LEBRUN, SUZANNE BAZIN et R. ROBINEAUX (*).

(*Institut Pasteur.*)

Des polynucléaires de cobaye, mis en suspension dans du sérum homologue frais et déposés sur une lame à la surface de laquelle ont été fixés par dessiccation des grains d'amidon de pomme de terre, se dirigent activement vers ces grains. Dès qu'ils les ont atteints, ils s'accolent à leur surface en prenant la forme de croissants réguliers. Nulle technique, à notre avis, n'est plus pratique pour étudier les phénomènes de chimiotactisme leucocytaire [4].

Dans des notes antérieures, nous avons pu montrer qu'entre lame et lamelle le déplacement orienté des globules blancs exige, pour se produire, un milieu de suspension convenable. En fait, nous n'avons jamais observé de migration leucocytaire lorsque les cellules étaient placées dans une solution simplement minérale (eau physiologique). Pour se diriger vers les grains d'amidon, les polynucléaires doivent se trouver dans un *milieu sérique*. Le sérum utilisé ne doit pas être nécessairement le sérum homologue (on peut se servir par exemple de leucocytes de cobaye et de sérum de cheval), mais il faut que ce sérum renferme en quantité suffisante deux (au moins) de ses constituants : le complément et les sels de calcium. Dans un sérum décomplémenté par vieillissement, par chauffage ou par adsorption sur des microbes sensibilisés, on n'observe jamais de tactisme : les cellules sont vivantes, elles demeurent capables d'émettre encore quelques pseudopodes mais leur déplacement est pratiquement nul [2]. Tout tactisme se trouve aussi complètement inhibé lorsqu'on opère avec un sérum dont le calcium a été bloqué (par le citrate de sodium) ou précipité (par l'oxalate de sodium). Sans doute, dans les sérums citratés, l'activité complémentaire est également abolie [3] mais il n'en est pas de même dans les sérums oxalatés, le complément étant ici respecté. On peut donc admettre en conclusion que, pour être capables de manifester *in vitro* leur sensibilité chimio-

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1^{er} février 1951.

tactique, les polynucléaires doivent être dans un milieu qui renferme à la fois du complément et des sels de calcium.

Ceci dit, ajoutons que ces conditions indispensables ne sont pas à elles seules suffisantes. Il faut encore que les cellules mises en expérience soient dans un état physiologique convenable. Dans la communication qui fait suite à celle-ci, nous indiquons comment nous avons pu avec des effecteurs d'enzymes — et cela sans toucher à la constitution normale du milieu sérique — suspendre tout chimiotactisme leucocytaire *in vitro* [4]. Ici, nous rapporterons les résultats remarquables que nous venons d'enregistrer en étudiant l'action d'huiles diverses sur les polynucléaires du cobaye.

Des polynucléaires de cobaye, présents dans un exsudat péritonéal de nature inflammatoire et réunis en culot par centrifugation, sont remis en suspension dans quelques centimètres cubes d'une huile d'olives neutre. La préparation ainsi faite est laissée pendant deux heures à la température du laboratoire. Elle est alors centrifugée et le culot leucocytaire, après lavage avec de l'eau physiologique, est repris par du sérum de cobaye frais. Une goutte de cette suspension est déposée sur une lame de verre chargée de grains d'amidon. Cette goutte est recouverte d'une lamelle. Celle-ci est lutée pour éviter toute dessiccation ultérieure. Finalement, la préparation est placée sur la platine d'un microscope et observée dans une chambre-étuve à 37°. On remarque, dans ces conditions, les faits suivants. Les polynucléaires sont morphologiquement en excellent état mais, arrondis, ils n'émettent sur place que quelques courts pseudopodes et ils ne montrent aucune tendance à se diriger vers les grains d'amidon ; autrement dit, le chimiotactisme est nul. Nous avons reproduit un grand nombre de fois ce type d'expérience et avec des huiles d'olives de sources diverses : le résultat n'a jamais varié.

Il était évidemment intéressant de savoir si ce phénomène particulier pouvait être observé, dans les mêmes conditions, avec des huiles d'une autre nature. Dans un premier temps, nous nous sommes servis de l'huile de paraffine et de l'huile de vaseline. En ces cas, le résultat obtenu fut radicalement différent ; le chimiotactisme observé fut très beau. Le contact préalable avec les huiles ne parut suivi d'aucune conséquence.

Nous avons alors recommencé les expériences — toujours dans des conditions identiques — en mettant en jeu diverses huiles qui, par leur nature chimique, se rapprochent davantage de l'huile d'olives, c'est-à-dire l'huile d'amandes douces, l'huile d'arachide et l'huile de lin (nous nous servions en tout cas, cela va sans dire, de préparations parfaitement neutres). Les résultats obtenus furent absolument comparables à ceux que nous avait fournis l'emploi de l'huile de paraffine et de l'huile de vaseline :

cellules d'apparence intacte, très étalées, chimiotactisme positif très net.

Compte tenu de ces résultats, nous pouvons donc dire qu'une seule huile paraît capable d'inhiber la sensibilité chimiotactique des polynucléaires de cobaye : c'est l'huile d'olives. Comment agit-elle ?

a) Les huiles d'olives que nous avons employées dont le pH était rigoureusement physiologique ne peuvent certainement pas être considérées comme des poisons banals pour les globules blancs. Les altérations cellulaires produites par un contact de dix-huit heures dans ces huiles sont un peu plus marquées que celles que l'on observe pour un séjour de même durée dans l'huile de paraffine, l'huile de vaseline ou l'huile d'arachide, mais elles ne sont pas plus intenses que celles qui sont déterminées par l'huile d'amandes douces ou l'huile de lin.

b) L'huile d'olives supprime-t-elle les migrations leucocytaires en modifiant les propriétés de surface des cellules ? Nous le penserions volontiers car nous avons pu remarquer que les globules blancs qui ont subi le contact de cette huile deviennent incapables, non seulement de se déplacer, mais aussi de saisir des corps étrangers, par exemple des microbes. Autrement dit, il y a inhibition à la fois du tactisme et de la phagocytose. Sans doute nous ne sommes pas parvenus, en étudiant la charge électrique des leucocytes traités par l'huile d'olives (et aussi bien par les autres huiles que nous avons également utilisées), à découvrir une modification de l'électrisation superficielle des cellules (1). Cela ne suffit pas cependant à indiquer qu'il n'y a pas eu adsorption d'un mince film d'huile ou de certaines molécules des constituants de l'huile par la surface cellulaire.

c) Une autre hypothèse pourrait encore être avancée. L'huile d'olives est certainement phagocytée par les polynucléaires. Peut-être un de ses constituants normaux — ou encore une des impuretés qu'elle renferme — ont-ils modifié l'équipement enzymatique des cellules et de telle manière que la mobilité cellulaire s'est trouvée abolie. En faveur de cette façon de penser, les résultats présentés dans le mémoire ci-après [4] ne sont pas sans plaider. Il faut pourtant remarquer que la sensibilité chimiotactique des cellules qui ont subi le contact de l'huile d'olives

(1) Les moyennes des mobilités électrophorétiques obtenues (distance en μ parcourue en une seconde par un leucocyte placé dans un champ de 1 volt/cm) ont été les suivantes :

Leucocytes témoins (mis directement dans l'eau physiologique)	0,394
Leucocytes traités d'abord par l'huile d'olives	0,399
Leucocytes traités d'abord par l'huile de paraffine	0,382
Leucocytes traités d'abord par l'huile de vaseline	0,375

est à jamais perdue ; or, ce fait n'a presque jamais été observé au cours de nos expériences avec des effecteurs d'enzymes : dès que ceux-ci sont éliminés du milieu, les cellules retrouvent toute leur sensibilité chimiotactique.

Et puis de quel constituant, de quelle impureté s'agirait-il ? Nous ne pouvons pas répondre. Qu'il nous suffise de dire que les polynucléaires de cobaye qui ont séjourné deux heures dans l'oléate de méthyle, dans une faible concentration de twin, dans du laurate de méthyle, une fois repris par le sérum homologue, restent parfaitement capables de s'étaler et de se mouvoir. Nous avons aussi fait diverses expériences en mettant en œuvre l'alcool oléique, l'oléate de sodium, l'acide oléique (dissous dans l'huile de paraffine), le glycérol. Toutes ces expériences ont échoué, les produits en cause, même rigoureusement neutralisés, ayant entraîné la lyse des cellules.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. COMANDON. Ces *Annales*, 1920, **34**, 1.
- [2] A. DELAUNAY et J. PAGES. Ces *Annales*, 1946, **72**, 458.
- [3] A. DELAUNAY. Ces *Annales*, 1944, **70**, 372.
- [4] J. LEBRUN et A. DELAUNAY. Ces *Annales*, sous presse.

RECHERCHES SUR LE TACTISME LEUCOCYTAIRE. ACTION, SUR CE PHÉNOMÈNE, DE DIFFÉRENTS EFFECTEURS D'ENZYMES

par JACQUELINE LEBRUN et A. DELAUNAY (*).

(C. N. R. S. et Institut Pasteur.)

INTRODUCTION. — Le tactisme des polynucléaires, tel qu'on peut le mettre en évidence par la technique de J. Comandon [1], requiert, pour se manifester normalement, un milieu de suspension qui contient à la fois des ions calcium et un facteur particulier, présent dans le sérum frais, dont les propriétés sont identiques à celles de l'alexine [2, 3, 4].

Des recherches plus récentes [5] nous ont appris qu'en dehors de ces conditions relatives au milieu, il en existe d'autres se rapportant à l'état biochimique de la cellule elle-même. C'est ainsi que le contact de doses non toxiques de cyanure de Na, qui ne modifient pas la teneur en Ca^{++} et le complément du milieu, mais qui diminuent le métabolisme respiratoire des cellules, inhibent totalement le tactisme. Les leucocytes, cependant, recouvrent leur pouvoir chimiotactique, même après un séjour prolongé dans le milieu cyanuré, lorsqu'ils sont remis en suspension dans du sérum normal.

Cette action, si frappante, du cyanure de sodium, nous a conduits à penser que le tactisme des globules blancs pouvait se trouver sous la dépendance de certaines réactions enzymatiques, et c'est afin de vérifier cette hypothèse et de préciser dans la mesure du possible la nature du ou des systèmes enzymatiques en cause que nous avons entrepris l'étude du comportement des polynucléaires en présence de différents effecteurs couramment utilisés en Enzymologie.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE. — Les leucocytes étudiés ont été obtenus à partir d'exsudats inflammatoires déterminés dans le péritoine de cobayes par deux injections de bouillon stérile. Une ponction de cette cavité, faite cinq heures après la première injection, permet en général de recueillir un liquide qui renferme environ 9 000 cellules par millimètre cube. Ce liquide est divisé

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 1^{er} février 1951.

en plusieurs fractions de 2 cm³ et celles-ci sont centrifugées à faible vitesse. Les culots sont finalement repris par un mélange composé de : 1 cm³ de sérum homologue frais et de 1 cm³ d'une solution plus ou moins concentrée d'un effecteur d'enzyme, cette solution en eau physiologique ayant été ajustée tout d'abord à pH 7,5.

Pour la série d'expériences rapportées ici, nous nous sommes servis des effecteurs suivants : *Azide de sodium*, *Hydroxylamine*, *Diéthylthiocarbamate de sodium*, *Dithizone*, *O. phénanthroline*, *Bisulfite de sodium*, *Cystéine*, *Acide thioglycolique*, *Fluoroacétate de sodium*, *Fluorure de sodium*, *Pyrophosphate de sodium*, *Uréthane* et *Acide malonique* [soit au total, 13 corps (1)].

Dans les préparations témoins, la solution d'effecteur était remplacée par un égal volume d'eau physiologique.

Toutes ces préparations, une fois obtenues, ont été soumises aux examens suivants :

1. *Examen du tactisme « in vitro »*. — I goutte de la suspension leucocytaire est déposée sur une lame de verre à la surface de laquelle ont été fixés par dessiccation des grains d'amidon de pommes de terre [4]. Elle est recouverte d'une lamelle. Celle-ci est lutée. Enfin, la préparation est placée sur la platine d'un microscope enfermé dans une chambre-étuve à 37°. Dans les conditions normales, c'est-à-dire lorsque toutes les conditions requises pour le déroulement d'un tactisme se trouvent réunies, on observe le phénomène suivant : en moins d'une heure, les polynucléaires, sans doute attirés par les dextrines solubles que libère l'amidon dans le milieu, se dirigent vers les grains. Ces derniers une fois atteints, les cellules s'accolent à leur surface en prenant la forme de croissants réguliers. Nous parlons d'une suppression totale du tactisme quand, au bout d'une heure, les leucocytes ne se sont pas groupés autour des grains d'amidon. Comme nous le montrerons plus loin, 11 effecteurs d'enzymes, sur les 13 que nous avons utilisés, ont été capables, à doses convenables, et sans entraîner la mort des cellules, de produire cet effet.

2. *Recherche du calcium et du complément*. — Calcium et complément sont, on le sait, absolument indispensables pour la mise en jeu *in vitro* d'un tactisme leucocytaire. Nous avons donc systématiquement vérifié la présence de ces deux éléments dans nos différents milieux de suspension. La présence du calcium fut mise en évidence par précipitation au moyen d'oxalate de sodium et identification microscopique des cristaux.

La richesse en complément a été déterminée avec l'aide de la

(1) Certains de ces produits, difficiles à trouver en France, nous ont été obligeamment fournis par M. G. Cohen. Nous prions notre collègue de bien vouloir trouver ici l'expression de toute notre gratitude.

méthode hémolytique (premier temps de la réaction de Calmette et Massol).

3. *Mesure du pouvoir phagocytaire et du métabolisme respiratoire des cellules.* — Quelle action des effecteurs d'enzymes capables de troubler le pouvoir chimiotactique des polynucléaires exercent-ils sur le pouvoir phagocytaire et le métabolisme respiratoire de ces cellules ? Il était évidemment intéressant de la connaître.

L'action sur le pouvoir phagocytaire a été évaluée d'après l'intensité avec laquelle des polynucléaires de cobaye ont englobé en une heure, et en présence de tel ou tel effecteur, des staphylocoques vivants. Etude de frottis colorés au bleu de méthylène.

La consommation en oxygène des leucocytes, également en présence d'effecteurs, a été mesurée par la méthode manométrique (appareil de Warburg). La quantité d'oxygène absorbée fut notée de demi-heure en demi-heure pendant soixante ou quatre-vingt-dix minutes et exprimée en millimètres cubes d'O₂ par million de cellules et par heure. La diminution du métabolisme respiratoire des cellules placées dans un milieu qui renfermait un effecteur d'enzyme a été calculée d'après ces chiffres et rapportée à 100 volumes d'oxygène.

4. *Appréciation du pouvoir cytotoxique propre à chaque effecteur d'enzyme.* — Nous avons considéré, au cours de ces expériences, comme dose optima, la plus petite quantité d'effecteur qui, *sans tuer la cellule*, a été capable de supprimer totalement le tactisme, l'examen des préparations étant fait au bout d'une heure.

Pour démontrer le caractère vivant des cellules, nous opérions de la façon suivante : après une heure de contact avec chacun des effecteurs employés, les suspensions cellulaires étaient centrifugées, le liquide surnageant était rejeté et le culot de leucocytes finalement repris par 2 cm³ de sérum de cobaye frais. I goutte de cette nouvelle préparation servait alors à faire un nouvel examen de tactisme. Celui-ci était-il positif — déplacement rapide des leucocytes vers les grains d'amidon — nous nous estimions en droit de conclure à l'intégrité des cellules.

Pour parfaire ce résultat, nous avons aussi étudié, en tous cas, l'effet d'un contact prolongé entre polynucléaires et effecteurs d'enzymes. Ce contact fut de dix-huit heures, en glacière, pour éviter dans la mesure du possible l'intervention spontanée des ferments protéolytiques. Passé ce délai, les préparations étaient centrifugées et le culot cellulaire était repris par 2 cm³ de sérum frais de cobaye. Avec cette nouvelle suspension nous faisons, dans les conditions habituelles, un examen du tactisme. Cette fois encore il nous permettait d'apprécier aisément le bon état, la vitalité, des cellules.

De plus amples détails sur les diverses techniques utilisées ici ont été donnés dans nos précédentes notes [2, 3, 4, 5]. Le lecteur pourra s'y reporter.

RÉSULTATS. — Rappelons que nous considérons comme dose optima, la plus petite quantité d'effecteur qui, *sans tuer la cellule*, supprime le tactisme (examen des préparations après une heure de séjour à 37°).

1. *Action de l'azide de sodium*. — Pour l'azide de sodium, cette dose optima correspond à la concentration M/7 (soit 9,2 mg/cm³). En présence de cet effecteur, les cellules contenues dans du sérum dilué de moitié restent en bon état, elles sont arrondies ou émettent quelques courts pseudopodes, mais elles ne se déplacent pas vers les grains d'amidon. Après centrifugation, rejet du liquide surnageant puis reprise du culot leucocytaire par du sérum frais, le tactisme, cependant, redevient normal.

Le pouvoir phagocytaire des polynucléaires n'est pas affecté par l'azide de sodium au même degré que leur pouvoir chimiotactique. Il est cependant un peu diminué.

La respiration est progressivement inhibée ; après quatre-vingt-dix minutes de contact, l'inhibition est environ de 50 p. 100.

L'azide de sodium ne bloque pas le calcium du milieu et il n'altère pas le complément.

Remarque. — L'azide de sodium, à la dose nécessaire pour inhiber le tactisme, s'avère, à la longue, toxique pour les cellules : cette toxicité, qui se manifeste non seulement par la perte du pouvoir chimiotactique mais encore par d'importantes altérations morphologiques des leucocytes, est évidente au bout de dix-huit heures de contact.

2. *Action de l'hydroxylamine*. — A la concentration M/15 (soit 2,2 mg/cm³), qui est ici la dose optima, le tactisme est complètement inhibé. Mais il est rétabli dès que l'effecteur d'enzyme a été éliminé du milieu.

La phagocytose est légèrement moins belle qu'en milieu sérique normal.

La respiration est diminuée de 50 p. 100 environ en une heure.

A la dose utilisée pour inhiber le tactisme, l'hydroxylamine ne bloque pas le calcium sérique et elle laisse le complément intact (fait déjà observé par Pillemer [6]).

Remarque. — Les cellules maintenues pendant longtemps en présence d'hydroxylamine à la concentration M/15 finissent par être altérées. Lésions nettes après dix-huit heures de contact.

3. *Action du diéthylthiocarbamate de sodium*. — La concentration optima correspond cette fois à M/30 (soit 4,9 mg/cm³).

A cette dose, l'effecteur d'enzyme inhibe le tactisme. Cependant, il ne parvient à exercer cette action qu'après un temps de

contact anormalement long (deux ou trois heures). De plus, en ce cas, le pouvoir chimiotactique des cellules n'est pas rétabli dès que celles-ci sont remises dans un milieu sérique normal. Plusieurs lavages sont nécessaires pour leur rendre ce pouvoir.

Phagocytose normale. Aucune action sur le calcium ou sur le complément. En présence du diéthylthiocarbamate de sodium, la respiration cellulaire est assez rapidement diminuée de 75 p. 100.

Remarque. — Toxicité apparemment négligeable.

4. *Action de la dithizone.* — Ce produit, très peu soluble, a été employé à demi-saturation dans du sérum au demi.

Dans un tel milieu, le tactisme des polynucléaires n'est que partiellement inhibé. Les cellules sont étalées et émettent de longs pseudopodes. La phagocytose est normale et la respiration cellulaire n'est pas sensiblement diminuée. Calcium et complément, enfin, ne sont pas touchés.

Remarque. — Employée dans les conditions qui viennent d'être indiquées, la dithizone ne manifeste aucun pouvoir cytotoxique, même après action prolongée (examen fait au bout de dix-huit heures).

5. *Action de l'O-phénanthroline.* — Ce produit, très peu soluble comme la dithizone, a été employé au 1/3 de saturation dans du sérum dilué au demi.

Dans ce milieu, le tactisme leucocytaire est totalement inhibé et les cellules restent rondes ; le tactisme, cependant, redevient parfait après élimination de l'effecteur. La phagocytose est un peu moins belle qu'en milieu sérique normal. La respiration cellulaire est lentement diminuée, de 40 p. 100 environ en une heure.

Calcium et complément ne sont pas touchés.

Remarque. — A cette dose le produit ne paraît pas être cytotoxique, même après un contact prolongé pendant dix-huit heures.

6. *Action du bisulfite de Na.* — Concentration optima : M/8 (soit 13 mg/cm³) dans du sérum au demi.

Dans ce milieu, le tactisme est inhibé totalement mais il réapparaît après élimination du produit. La phagocytose est partiellement diminuée. L'absorption d'O₂ est considérablement augmentée. Mais cette augmentation ne paraît pas tenir à une modification du métabolisme cellulaire, car elle existe au même degré dans un milieu qui ne renferme pas de leucocytes.

La teneur en calcium et en complément n'est pas modifiée.

Remarque. — Après dix-huit heures de contact en présence de bisulfite de Na à concentration M/8, les cellules reprises par du sérum frais ne recouvrent qu'une faible partie de leur pouvoir chimiotactique et elles montrent des altérations morphologiques importantes.

7. *Action de l'uréthane.* — Concentration optima : M/5 (soit 15 mg/cm³) dans du sérum au demi.

Dans ce milieu, il y a inhibition totale du tactisme leucocytaire mais le tactisme redevient normal dès que l'uréthane a été éliminé du sérum. La phagocytose, en présence de ce produit, est légèrement diminuée. La respiration est progressivement inhibée (en une heure et demie) dans une proportion de 75 p. 100.

Calcium et complément restent intacts.

Remarque. — L'action cytotoxique de l'uréthane (à la dose ici employée) paraît être nulle, même après un contact prolongé.

8. *Action du fluorure de Na.* — Concentration optima : M/4 (soit 10,5 mg/cm³) dans du sérum dilué au demi. Dans un tel milieu, le tactisme est totalement inhibé mais, cette fois encore, il redevient normal lorsque, après une heure de contact avec le fluorure, les cellules sont remises dans un sérum normal. La phagocytose est diminuée.

Le complément n'est pas touché. En revanche, le calcium a été éliminé du milieu.

Remarque. — On note des altérations très nettes lorsque les leucocytes ont été maintenus dix-huit heures dans du sérum qui contient le fluorure de Na à concentration M/4.

9. *Action du pyrophosphate de Na.* — Concentration optima : M/200 (soit 2,2 mg/cm³) dans du sérum au demi.

Dans ce milieu, inhibition totale du tactisme mais le phénomène survient de nouveau lorsque les globules blancs, après une heure de contact avec l'effecteur d'enzyme, sont remis en suspension dans un sérum normal. Phagocytose convenable.

Le calcium a été éliminé du milieu, le complément est détruit ; du moins il n'exerce plus son pouvoir hémolytique.

Remarque. — Action cytotoxique nulle, même après contact prolongé.

10. *Action de la cystéine.* — Concentration optima : M/10 (soit 10 mg/cm³) dans du sérum au demi.

Dans ce milieu, inhibition totale du tactisme mais, comme dans la plupart des cas précédents, le phénomène est rétabli par élimination de la cystéine. Phagocytose normale.

Le calcium ne paraît pas touché mais le complément est en grande partie détruit.

Remarque. — Action cytotoxique nulle, même après contact prolongé.

11. *Action de l'acide thioglycolique neutralisé.* — Concentration optima : M/32 (soit 3 mg/cm³) dans du sérum au demi.

Dans ce milieu le tactisme est totalement inhibé. Il survient de nouveau dès que les cellules ont été transportées dans un sérum neuf. La phagocytose est un peu diminuée.

Teneur en calcium normale ; en revanche, l'activité complémentaire du milieu paraît légèrement altérée.

Remarque. — La dose utilisée ici ne paraît pas toxique, même

lorsque les leucocytes ont été maintenus à son contact pendant dix-huit heures.

12. *Action du fluoroacétate de Na.* — Concentration optima : M/20 (soit 5 mg/cm³) dans du sérum au demi.

Dans ce milieu, le tactisme est totalement inhibé mais il est rétabli aussitôt après l'élimination de l'effecteur. Le calcium reste intact mais le complément est partiellement altéré.

13. *Action de l'acide malonique neutralisé.* — Concentration optima : M/10 (soit 10,4 mg/cm³) dans du sérum au demi.

Dans ce milieu, le tactisme n'est pas totalement inhibé, il est cependant beaucoup moins accusé que normalement. Il redevient parfait lorsque les cellules sont reprises, après centrifugation, par du sérum frais. Phagocytose légèrement diminuée.

Calcium intact ; complément altéré.

Remarque. — L'acide malonique neutralisé, à la dose employée ici, finit par altérer quelque peu le bon état des leucocytes.

DISCUSSION. — Résumons, tout d'abord, nos observations (voir tableau). Utilisés à dose et à pH convenables, 10 sur les 13 effecteurs d'enzymes que nous avons utilisés ont été capables *in vitro*, sans tuer les cellules, de supprimer le pouvoir chimiotactique des polynucléaires du cobaye. Ce sont l'azide de sodium, l'hydroxylamine, l'orthophénanthroline, le bisulfite de Na, l'uréthane, la cystéine, l'acide thioglycolique, le fluoroacétate de Na, le fluorure de Na, enfin le pyrophosphate de Na. En présence de ces différents corps, l'inhibition du tactisme a été immédiate et totale. Le phénomène, cependant, a été réversible. Les cellules ont retrouvé tout leur pouvoir chimiotactique dès que les effecteurs en cause ont été éliminés du milieu.

Le diéthylthiocarbamate de sodium, effecteur dont nous nous sommes également servis, exerce une action un peu particulière. Dissous dans un milieu sérique à la concentration M/30 (soit 4,9 mg/cm³), il est capable lui aussi d'inhiber le tactisme mais son effet n'est pas immédiat, un certain temps de contact avec les cellules est nécessaire. D'autre part, les leucocytes qui ont subi son atteinte ne retrouvent pas leur pouvoir chimiotactique dès qu'ils sont remis dans un milieu normal. Pour leur rendre ce pouvoir, il faut les soumettre à plusieurs lavages. Sans doute, pour expliquer ce fait particulier, doit-on prendre en considération la lenteur de pénétration et de diffusion du produit dans le cytoplasme cellulaire.

Les deux autres effecteurs que nous avons enfin mis en œuvre : la dithizone et l'acide malonique neutralisé, tout au moins aux doses que nous avons employées, n'ont pas été capables de supprimer complètement le tactisme. Néanmoins, ils l'ont diminué dans une notable proportion.

Action de différents effecteurs d'enzymes sur les leucocytes d'exsudat et le sérum de cobaye.

NATURE ET CONCENTRATION de l'effecteur utilisé	TACTISME DES CELLULES		POUVOIR phagocytaire (staphylocoques)	MÉTABOLISME respiratoire	ACTION SUR DIVERS constituants du milieu	
	En présence de l'effecteur	Remises, après élimination de l'effecteur, dans un milieu sérique normal			Calcium	Complément
Cyanure de Na, M/90	0	+++	Normal.	Inhibé à 75 p. 100.	0	0
Azide de Na, M/7	0	+++	Diminué.	Inhibé à 50 p. 100.	0	0
Hydroxylamine, M/15	0	+++	Légèrement diminué.	Inhibé à 50 p. 100.	0	0
Diéthylthiocarbamate de Na M/30 .	0	+++	Normal.	Inhibé à 75 p. 100.	0	0
	Seulement après 2 heures de contact.	mais seulement après nombreux lavages.				
Dithizone 1/2 saturation.	±	+++	Normal.	Pas d'inhibition.	0	0
O. phénanthroline 1/3 saturation . .	0	+++	Très diminué.	Inhibé à 40 p. 100.	0	0
Bisulfite de Na, M/8.	0	+++	Très diminué.	Très forte augmentation de la consommation d'O ₂ sans cellules; pas d'action sur la respiration.	0	0
Uréthane, M/5.	0	+++	Légèrement diminué.	Inhibé à 75 p. 100.	0	0
Cystéine, M/40	0	+++	Normal.		0	En grande partie altéré.
Acide thioglycolique neutralisé, M/32.	0	+++	Légèrement diminué.		0	Légèrement altéré.
Fluoroacétate de Na, M/20	0	+++		Consommation d'O ₂ semble augmentée.	0	En partie altéré.
Acide malonique neutralisé, M/7 . .	±	+++	Très diminué.	Inhibé à 50 p. 100.	0	Détruit.
	Pas totalement inhibé.					
Fluorure de Na, M/4	0	+++	Très diminué.		Éliminé.	0
Pyrophosphate de Na, M/200	0	+++	Normal.		Éliminé.	Détruit.

Nous avons, par ailleurs — du moins lorsque ces examens n'ont pas été rendus impossibles par la trop petite quantité de produit dont nous disposions —, étudié l'action des mêmes effecteurs d'enzymes sur la phagocytose et sur le métabolisme respiratoire des polynucléaires. En général, ces deux propriétés nous ont paru être beaucoup moins troublées que le tactisme. La phagocytose est parfois diminuée mais, d'après nos constatations, elle n'est jamais complètement supprimée. La consommation d'oxygène est parfois inhibée de 75 p. 100 (par exemple, en présence de diéthyl-dithiocarbamate de Na et d'uréthane) mais, plus souvent, elle n'est abaissée que de 40 à 50 p. 100. Le bisulfite de Na et la dithizone, même, n'ont exercé (aux doses utilisées) aucune action sur la respiration cellulaire.

Faut-il s'étonner de ces actions inégalement fortes produites par des effecteurs d'enzymes sur le tactisme, la phagocytose et le métabolisme respiratoire des leucocytes? Nous ne le pensons pas, car plusieurs auteurs ont déjà signalé que la division et la motilité cellulaires peuvent être inhibées par différents corps à des concentrations qui ne font que diminuer légèrement ou qui, au contraire, stimulent la consommation d'oxygène [8, 9].

Ceci dit, voyons comment les effecteurs d'enzymes ici utilisés ont pu — tout en respectant la vie des leucocytes — supprimer le tactisme, totalement ou partiellement.

1° Il ressort de nos recherches que deux de ces effecteurs : le fluorure de Na et le pyrophosphate de Na, sont capables de précipiter le calcium du milieu. De cette seule action dépend peut-être l'abolition du tactisme puisque — nous le savons déjà — tout déplacement orienté des globules blancs devient impossible dans un milieu privé d'ions calcium.

2° Quatre autres effecteurs : la cystéine, l'acide thioglycolique neutralisé, le fluoroacétate de Na et l'acide malonique neutralisé, gênent à des degrés divers l'hémolyse des globules rouges sensibilisés par un sérum frais. Ils ont donc une activité anticomplémentaire. Celle-ci pourrait suffire à expliquer — compte tenu de nos observations antérieures — comment ces corps parviennent également à inhiber le tactisme.

3° Reste maintenant à considérer les sept autres composés, c'est-à-dire l'azide de Na, l'hydroxylamine, l'orthophénanthroline, le diéthyl-dithiocarbamate de Na, la dithizone, le bisulfite de Na et l'uréthane. Toutes ces substances ne semblent avoir aucune influence sur le complément ou le calcium du milieu sérique. Pourtant, elles font perdre aux leucocytes leur pouvoir chimiotactique. Comment exercent-elles cette action?

Ces diverses substances ont une propriété commune. Elles sont toutes des effecteurs d'enzymes. A ce titre elles troublent le fonctionnement normal de nombreux systèmes diastasiques. Elles

produisent cependant cet effet par des mécanismes différents. Ainsi, le diéthylthiocarbamate de Na, la dithizone, l'orthophé-nanthroline, bloquent des enzymes en formant un complexe avec leurs constituants métalliques. Le bisulfite de Na, l'hydroxylamine interviennent dans de nombreuses réactions par leur affinité pour les groupements carbonyle. L'uréthane altère certaines déhydro-génases. L'azide de Na, l'hydroxylamine et le cyanure de Na, enfin, se comportent souvent comme des antiperoxydases ; en particulier, K. Agner a pu montrer que ces trois substances suppriment, *in vitro*, l'activité de la verdroperoxydase, diastase extraite des polynucléaires eux-mêmes [10].

Est-ce en inhibant certains enzymes intracellulaires que les différents produits que nous étudions dans ce travail ont aboli le tactisme des globules blancs ? C'est très possible. Il faut néanmoins remarquer que les doses nécessaires pour déterminer ce phénomène — bien que certaines d'entre elles ne soient pas supérieures à celles que l'on met en œuvre pour suspendre d'autres activités cellulaires qui sont liées manifestement à des activités enzymatiques comme la division en cultures de tissus — sont tout de même très élevées et, qu'à si fortes concentrations, les substances en question sont capables non seulement d'inhiber un enzyme mais encore de modifier diverses propriétés de la cellule, notamment sa perméabilité et ses propriétés de surface. Dans le cas particulier examiné ici, doit-on faire dépendre la suspension du tactisme de l'atteinte directe d'un ou de plusieurs enzymes ou d'une action plus générale sur la cellule ?

a) Envisageons en premier lieu l'hypothèse d'une *action anti-enzymatique*. Que des enzymes interviennent dans la production d'un tactisme, le fait ne peut pas être mis en doute. On comprendrait mal en effet comment ce phénomène complexe qui entraîne une dépense d'énergie, qui implique l'existence de contractions et de déformations protoplasmiques importantes, pourrait se produire sans l'intervention de réactions diastatiques (2).

Pourtant il faut reconnaître que la nature de telles réactions reste très mal connue [11]. Au surplus, quels enzymes seraient bloqués dans nos expériences ? Nous ne pouvons le dire car, ainsi que nous l'avons vu, les substances antidiastasiques qui s'avèrent capables de suspendre, *in vitro*, le tactisme leucocytaire sont capables d'intervenir sur des enzymes ou même sur des groupes d'enzymes très différents.

b) Une *modification de la perméabilité cellulaire* pourrait-elle

(2) Nous croyons intéressant de rappeler à ce sujet que l'on n'est jamais parvenu à mettre en évidence, chez le lymphocyte, une sensibilité chimiotactique. Or, cette cellule se distingue du polynucléaire par un équipement diastatique tout à fait différent.

être capable à elle seule de déterminer une inhibition du tactisme ? Oui, sans doute, dans la mesure où elle empêche certains métabolites indispensables ou certains ions comme le calcium de pénétrer dans la cellule. En faveur d'un tel mécanisme, nous ferions volontiers valoir les caractères particuliers de l'inhibition que nous avons généralement remarqués au cours de ces expériences, c'est-à-dire sa rapidité et sa fugacité.

Pour essayer de mieux fixer ce point, nous avons étudié la perméabilité des leucocytes au rouge neutre en présence de divers effecteurs d'enzymes ajoutés au milieu à des doses qui inhibent le tactisme. Nous avons alors observé les faits suivants. Le colorant a pénétré et il s'est accumulé normalement dans les polynucléaires, malgré le cyanure de Na [5], le diéthylthiocarbamate de Na, la dithizone, l'orthophénanthroline, le bisulfite de Na et l'uréthane. Seuls, l'hydroxylamine et surtout l'azide de Na ont gêné sa diffusion dans le corps de la cellule. La perméabilité cellulaire au rouge neutre n'est donc pas altérée dans la majorité des cas.

Cette perméabilité pour des substances à petites molécules pourrait-elle être modifiée par des effecteurs d'enzymes ? Nous ne le savons pas.

c) Considérons enfin notre troisième hypothèse, celle qui met en cause une *modification des propriétés de surface des leucocytes*. Au cours de nos expériences, un fait n'a jamais manqué de retenir notre attention : presque toujours, dans les milieux qui contiennent un effecteur d'enzyme, non seulement les polynucléaires ne se dirigent pas vers les grains d'amidon, mais ils conservent une forme arrondie. Ils peuvent encore émettre de courts pseudopodes, mais jamais ils ne s'étalent vraiment sur la lame de verre.

Il n'est pas interdit de penser que cette inaptitude à l'accolement joue un rôle décisif dans l'inhibition du tactisme. Cependant, on admet généralement que l'étalement des cellules sur un support solide est une question de tension superficielle. Or, aucun des effecteurs que nous avons employés ne possède, à notre connaissance, d'action notable sur les propriétés de surface des leucocytes.



Que conclure ? Manifestement, aucune des hypothèses que nous venons de formuler ne paraît suffisamment étayée par des faits. Pourtant, si dès maintenant il fallait choisir, nous accorderions volontiers notre préférence à celle qui met en cause un blocage enzymatique dans le corps des cellules.

RÉSUMÉ.

Utilisés à dose et à pH convenables, 13 effecteurs d'enzymes se sont montrés capables *in vitro*, sans tuer les cellules, de supprimer totalement ou partiellement le pouvoir chimiotactique des polynucléaires du cobaye. Ce sont : 1° le fluorure de Na (M/4) ; 2° le pyrophosphate de Na (M/200) ; 3° la cystéine (M/10) ; 4° l'acide thioglycolique (M/32) ; 5° le fluoroacétate de Na (M/20) ; 6° l'acide malonique (M/7) ; 7° l'azide de Na (M/7) ; 8° l'hydroxylamine (M/15) ; 9° le diéthylthiocarbamate de Na (M/30) ; 10° la dithizone (à demi-saturation) ; 11° l'orthophénanthroline (au tiers de saturation) ; 12° le bisulfite de Na (M/8) ; 13° l'uréthane (M/5).

Certains de ces effecteurs paraissent avoir exercé cette action en abaissant la teneur en calcium (n°s 1, 2) ou en complément (n°s 3, 4, 5, 6) du milieu. L'effet des autres effecteurs semble avoir porté directement sur les leucocytes, mais par un mécanisme qui reste encore à élucider (action purement anti-enzymatique ou encore action sur la perméabilité ou les propriétés de surface des cellules).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. COMANDON. *Ces Annales*, 1920, **34**, 1.
- [2] A. DELAUNAY. *Ces Annales*, 1944, **70**, 372.
- [3] A. DELAUNAY et J. PAGÈS. *Ces Annales*, 1946, **72**, 458.
- [4] A. DELAUNAY et J. PAGÈS. *Rev. Immunol.*, 1946, **10**, 33.
- [5] J. LEBRUN-PAGÈS et R. ROBINEAUX. *Ces Annales*, 1950, **79**, 416.
- [6] L. PILLEMER, J. SEIFTER et E. ECKER. *J. Immunol.*, 1941, **40**, 89.
- [7] L. PILLEMER, J. SEIFTER et E. ECKER. *J. Immunol.*, 1941, **40**, 97.
- [8] H. LARDY et P. H. PHILLIPS. *J. Biol. chem.*, 1943, **149**, 177.
- [9] W. D. McELROY. *Quart. Rev. Biol.*, 1947, **22**, 25.
- [10] K. AGNER. *Adv. Enzym.*, 1943, **3**, 137.
- [11] L. MONNÉ. *Adv. Enzym.*, 1948, **8**, 1.

ÉTUDE COMPARATIVE DU COMPORTEMENT A 44° DE DEUX PHAGES STAPHYLOCOCCIQUES

par M.-P. BEUMER-JOCHMANS.

(Institut Pasteur de Bruxelles.)

Doerr et Gruninger [4] et Linz [6] ont observé qu'à température comprise entre 43 et 45° C, divers bactériophages sont incapables de se multiplier et de lyser les bactéries qu'ils lysent à 37°. Certains même, mis à 44° en présence de ces bactéries, disparaissent. Linz a montré, en outre, que la disparition du phage des cultures à 44° n'a lieu que si les bactéries sensibles sont en voie de multiplication. Les sérums antimicrobiens, qui inhibent la lyse à 37°, inhibent également la disparition du phage à 44°, vraisemblablement en empêchant sa fixation sur les germes sensibles.

Nous avons comparé, à ce point de vue, le comportement de deux phages staphylococciques. L'un (H) disparaît des cultures à 44°, tandis que l'autre (Twort) s'y maintient au titre initial.

La disparition du phage à 44° paraissant, comme sa multiplication à 37°, liée à la présence des bactéries sensibles en cours de développement, nous avons étudié comparativement, à ces deux températures, la fixation du phage sur les germes sensibles, ainsi que les variations du nombre des corpuscules actifs et des germes viables au cours du développement des cultures.

Nous avons recherché qu'elle était l'action, à 44°, sur ces deux phages staphylococciques, de l'hydrolysate acide de caséine et d'extrait de levure, dont l'action sur la multiplication du phage de *Staphylococcus muscae* a été étudiée par Price [7, 8], ainsi que de facteurs, indispensables à la reproduction de certains phages staphylococciques, mis en évidence par Rountree [9] dans le complexe des vitamines B et dans le bouillon non autoclavé. Ces facteurs ne sont généralement pas nécessaires à la croissance des germes sensibles, ou seulement en quantités inférieures à celles exigées pour la multiplication des bactériophages.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

Nous avons choisi pour ce travail deux phages staphylococciques, les phages H et Twort, que nous avons étudiés précédemment [2].

Le premier, actif sur un très grand nombre de staphylocoques dorés et blancs, pathogènes ou non, donne sur gélose ordinaire de très petites taches ; il est donc probablement de grande taille. Le second, à taches moyennes, et par conséquent plus petit, lyse uniquement deux staphylocoques blancs, non pathogènes, les staphylocoques Twort et Ew.

Les germes sensibles utilisés sont : le staphylocoque JB (doré pathogène) sensible au phage H et les staphylocoques Twort et Ew sensibles aux phages H et Twort.

Les cultures sont faites en bouillon ordinaire, en tubes contenant 5 cm³, au bain-marie à 44° ou à l'étuve à 37°. Les ensemencements sont faits au moyen de 1 goutte de culture de vingt-quatre heures du germe sensible en bouillon.

Les numérations de phages sont toujours faites à 37° selon la méthode de la double couche de gélose décrite par Gratia [5], et, sauf si on spécifie le contraire, à partir des cultures totales et non à partir de filtrats.

Les numérations de germes sont faites à 37° par dénombrement des colonies sur boîtes de gélose.

Les nombres de phages et de germes sont toujours exprimés par goutte (0,05 cm³).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. COMPORTEMENT DU PHAGE H A 44°. — Lorsqu'on ensemence simultanément deux tubes de bouillon ordinaire, l'un avec 1 goutte de phage H et 1 goutte de culture du staphylocoque JB, l'autre avec 1 goutte de culture seulement, le développement de la culture témoin, après quatre heures trente à 37°, est déjà abondant, tandis que la culture additionnée de phage, après s'être légèrement troublée, s'est complètement éclaircie. Si l'on répète cette expérience à 44°, la culture avec phage se développe aussi rapidement que la culture témoin, et il n'y a pas d'éclaircissement même après vingt-quatre heures.

Suivons par des numérations échelonnées dans le temps les variations du nombre de germes et de phages à 44° et à 37°.

On place au bain-marie, à 44°, deux tubes de bouillon contenant, l'un 110 000 staphylocoques JB par goutte, l'autre 110 000 staphylocoques JB et 76 700 phages H. Une paire de tubes identiques est mise à l'étuve à 37°.

En deux heures trente minutes, à 44°, le nombre de phages tombe à 4 200, soit 5 à 6 p. 100 du phage ensemencé, tandis que le nombre de germes s'élève à 295 000. Dans le témoin, on compte 205 000 germes. Pendant ce temps, à 37°, le phage s'est multiplié soixante-dix fois, la culture est en voie de lyse et dans le témoin on compte environ 572 000 germes.

Le phage H, simplement dilué en bouillon, conserve toute son activité, même après vingt-quatre heures de séjour à 44°. En présence de la culture sensible, au contraire, on ne retrouve, dans les mêmes conditions, que 1/1 000 à 1/2 000 du phage mis en œuvre.

On voit qu'en présence du staphylocoque JB en voie de multiplication, la disparition du phage H à 44° s'amorce aussi précocement que sa multiplication à 37°, puisqu'en deux heures trente 95 p. 100 du phage ensemencé ont disparu. Contrairement à ce qui se passe à 37°, le nombre de bactéries viables à 44° est le même dans la culture avec phage et dans la culture sans phage. Le phage paraît ici sans action sur les bactéries sensibles, aussi avons-nous vérifié que sa fixation s'effectue normalement sur les germes sensibles à 44°.

Plaçons simultanément au bain-marie à 44° et à l'étuve à 37°, deux tubes de bouillon contenant chacun environ 267 000 corpuscules de phage par goutte et IV gouttes d'une suspension épaisse du staphylocoque JB, obtenue en récoltant une culture de vingt-quatre heures sur gélose, dans X gouttes de bouillon. Après une heure, on dénombre à 44°, 144 000 phages dont 80 sont libres ; à 37°, 520 000 phages dont 2 734 sous forme libre.

On voit que le phage H se fixe sur les staphylocoques sensibles aussi bien à 44° qu'à 37°. Remarquons, en outre, qu'après une heure le phage a déjà disparu en partie à 44°, tandis qu'il s'est multiplié à 37° ; il y a probablement un peu de phage libre nouvellement formé.

Si l'on augmente fortement la quantité de phage H par rapport au nombre de staphylocoques JB ensemencés, ceux-ci ne se développent à 44° qu'avec un retard de plusieurs heures. Cependant le staphylocoque JB finit toujours par se développer et aussi abondamment que dans la culture sans phage. Après vingt-quatre heures, lorsque les deux cultures sont également développées, on retrouve généralement de mille à trois mille fois moins de phage qu'au départ.

Il nous a paru utile de rechercher ce qu'il advient du phage et des germes pendant les quelques heures d'inhibition complète de la culture.

Si l'on ensemence, par goutte de bouillon, 3 380 000 phages pour 33 800 germes, le bouillon reste limpide pendant six à sept heures, mais après une heure, on ne compte plus que 2 300 000 phages et 200 germes, et après six heures trente minutes, 150 000 phages pour 5 germes. Après vingt-quatre heures, il reste 926 phages, mais on dénombre 5 200 000 germes et 4 940 000 dans le témoin sans phage.

Pendant la période d'inhibition de la culture, l'inactivation du phage s'accompagne donc de la mort de l'immense majorité des

bactéries sensibles. Cette action létale du phage pour les germes sensibles à 44° ne se manifeste, comme le « killing effect » décrit par Andrewes et Elford [4] pour un coliphage à 37°, que si le phage est très abondant. Lorsqu'il est utilisé en quantité moindre, il n'y a pas de « killing » : les germes restent viables jusque peu de temps avant que ne débute la lyse.

Si on appauvrit, par contact avec les germes sensibles, un lysat très riche en phage H, il perd de ce fait son action inhibitrice sur la culture du staphylocoque JB à 44°. Il semble donc que c'est le phage lui-même qui est responsable de l'activité bactéricide du lysat, et non un produit du métabolisme bactérien, analogue par exemple au facteur bactériostatique de Wahl et Josse-Goichot [10]. L'intervention d'un antibiotique présent dans le lysat paraît peu vraisemblable également, le phage H ayant toujours été régénéré sur le staphylocoque JB lui-même.

II. COMPORTEMENT DU PHAGE TWORT A 44°. — Si nous répétons avec du phage Twort et du staphylocoque Twort l'expérience réalisée avec le phage H et le staphylocoque JB, nous voyons que dès les premières heures d'incubation à 44°, la culture contenant le phage est moins abondante que la culture témoin, mais contrairement à ce qui se passe avec le phage H ce retard ne sera jamais comblé. Bien plus, après quarante-huit heures, cette culture sera presque complètement éclaircie. Les numérations du phage faites après sept heures, vingt-quatre heures et quarante-huit heures montrent que le taux de celui-ci reste à peu près constant pendant toute la durée de l'expérience.

A l'ensemencement, 1 goutte du mélange

contient	1 300 × 10 ³ corpuscules.
Après 7 heures	1 410 × 10 ³ corpuscules.
Après 24 heures	510 × 10 ³ corpuscules.
Après 48 heures	1 340 × 10 ³ corpuscules.

Après quarante-huit heures d'incubation à 44°, la culture avec phage est filtrée sur bougie Chamberland L3. On ne compte plus alors que 66 corpuscules par goutte de filtrat, la quasi totalité du phage était donc du phage fixé.

X gouttes de ce filtrat introduites au moment de l'ensemencement dans une culture du staphylocoque Twort en provoquent la lyse partielle en vingt-quatre heures à 44°. Après quarante-huit heures, la lyse a encore progressé, sans toutefois être complète. L'étalement de la culture totale permet de dénombrer à ce moment 750 000 corpuscules par goutte de culture non diluée. Après filtration sur bougie Chamberland L3, on en retrouve 27 000 dans le filtrat. Cette fois, quoique l'ensemencement en phage ait été très pauvre (6,6 particules par goutte de bouillon ensemencé), la multiplication a été considérable.

Des passages successifs permettent dès lors d'obtenir régulièrement la multiplication du phage Twort à 44°. Dès le quatrième passage, on obtient une lyse totale en cinq heures trente à la dilution 10^{-1} et au cinquième passage une lyse totale à 10^{-2} en six heures trente. Nous avons ainsi réalisé dix passages successifs. Le filtrat du dixième passage, que nous appellerons Twort/10, contient 210×10^5 corpuscules par goutte. A 44°, il lyse partiellement les cultures du staphylocoque Twort jusqu'à la dilution 10^{-8} en vingt-quatre heures. A 37°, il lyse complètement ce germe, sans culture secondaire, aussi rapidement et au même titre que le phage Twort originel, du même âge, régénéré à 37°, c'est-à-dire qu'en vingt-quatre heures, il donne une lyse totale jusqu'à la dilution 10^{-9} .

Le phage Twort/10 régénéré à 37°, au cours de dix passages successifs, garde intact son pouvoir de lyser le staphylocoque Twort à 44°.

Par des passages successifs, on peut également entraîner le phage Twort à lyser le staphylocoque Ew à 44° ; le phage ainsi obtenu lyse aussi bien les staphylocoques Twort et Ew, à 44° et à 37°.

Les phages H et Twort, qui se distinguent l'un de l'autre par l'étendue de leur gamme d'action à 37° et sans doute aussi par leur taille, se différencient encore par la manière dont ils se comportent à 44° au contact de la culture sensible. Cette différence de comportement à 44° est bien le fait du phage et non des germes, car les résultats sont identiques si l'on fait agir le phage H sur le staphylocoque Twort plutôt que sur le staphylocoque JB. On peut mettre cette différence en évidence de façon particulièrement nette en faisant agir simultanément, et en mélange, du phage H et du phage Twort/10 sur le staphylocoque Twort à 44°. On obtient, en quelques heures, la lyse totale de la culture, avec multiplication du phage Twort/10, et perte d'activité du phage H, exactement comme dans les tubes où ces phages ont été ensemencés séparément.

III. RECHERCHE DE FACTEURS SUSCEPTIBLES DE PERMETTRE OU D'ACTIVER LA MULTIPLICATION DES PHAGES H, TWORT ET TWORT/10.

- Nous avons recherché l'action sur les phages H, Twort et Twort/10 à 44° et à 37°, d'un extrait de levure préparé par autoclavage en eau distillée selon une technique décrite par Dirkx [3], d'un extrait de viande non stérilisé par la chaleur et d'hydrolysât de caséine sans vitamines (Difco).

1. *Préparation de l'extrait de viande.* — 500 g de viande de bœuf hachée et dégraissée et 1 100 cm³ d'eau de ville sont mélangés et portés à ébullition pendant une demi-heure, puis filtrés sur un linge pour séparer la viande. On laisse refroidir le filtrat jusqu'au len-

demain ; il est légèrement acide (pH 5,5). On filtre à froid sur papier pour dégraisser, on neutralise et on stérilise l'extrait ainsi obtenu par filtration sur Seitz.

2. *Test d'activité des extraits.* — On prend 4 tubes de bouillon (5 cm³ par tube) de même diamètre. A 2 de ces tubes, on ajoute X gouttes (0,5 cm³) d'extrait, aux 2 autres X gouttes de bouillon. Chaque tube estensemencé de 1 goutte de culture de vingt-quatre heures en bouillon ordinaire du staphylocoque sensible. Un des tubes avec extrait et un des témoins reçoivent en outre 1 goutte du phage dilué de manière à provoquer la lyse totale du témoin, en six à huit heures. Une lyse trop rapide du témoin est à éviter car dans ce cas l'action de l'extrait est trop difficile à saisir.

Les numérations du phage sont toujours faites au moment où la lyse est nette dans le tube avec extrait et peu ou pas visible dans le témoin. En effet, il s'agit généralement de mettre en évidence une accélération de la multiplication et non une augmentation absolue du phage.

L'addition, au milieu de culture, d'extraits de viande ou de levure et d'hydrolysats de caséine produit des effets différents, selon que l'on considère les phages Twort et Twort/10 ou le phage H.

En bouillon + extrait de viande à 37° et 44°, la lyse du staphylocoque Twort par les phages Twort et Twort/10 débute une à deux heures plus tôt qu'en bouillon ordinaire.

Ces lyses précoces s'accompagnent d'une multiplication accélérée du phage : au moment où la lyse est nette en bouillon + extrait de viande et peu ou pas visible en bouillon ordinaire, on compte en bouillon + extrait de viande de cinq à dix fois plus de corpuscules de phage qu'en bouillon simple. Lorsque la lyse s'est achevée dans les deux milieux, ils contiennent chacun la même quantité de phage. En présence de cet extrait, on observe donc à 44° une multiplication du phage Twort qui n'est pas apparente en bouillon.

L'extrait de levure accélère aussi la multiplication des phages Twort et Twort/10, mais, de façon moins marquée que l'extrait précédent.

La substance active de ces extraits est précipitable par l'alcool, elle est détruite par autoclavage en milieu neutre ou alcalin, mais résiste parfaitement à 120° pendant vingt minutes en milieu acide (pH 1 à 5). Nous avons vérifié que l'extrait de viande n'a aucune action sur la croissance du staphylocoque Twort, mais que l'extrait de levure la favorise très légèrement.

D'autre part, ces extraits sont sans action sur la multiplication du phage H à 37° ni sur sa disparition à 44°.

L'addition au bouillon de X gouttes d'une solution d'hydrolysats acide de caséine sans vitamines à 12 p. 100 n'accélère pas la lyse du staphylocoque Twort par le phage Twort à 44°, mais

augmente de cinq à dix fois la quantité de phage produite. Dans certains lots de bouillon, cette augmentation est déjà apparente après six heures, dans d'autres elle ne l'est qu'après vingt-quatre heures seulement. Enfin, ajouté à certains bouillons, l'hydrolysate retarde légèrement le développement du staphylocoque Twort. A 37°, il n'affecte pas la lyse du staphylocoque Twort par le phage Twort, ni la multiplication de ce dernier.

L'hydrolysate acide de caséine n'a pas d'action sur la disparition du phage H à 44°. Ici encore, nous avons remarqué la nécessité d'opérer en milieu de composition constante, car, ajouté à certains lots de bouillon, l'hydrolysate accentue l'effet inhibiteur du phage sur le développement de la culture sensible. Cet effet n'est pas visible avec tous les bouillons. A 37°, l'hydrolysate paraît augmenter légèrement la multiplication du phage H.

CONCLUSIONS.

L'étude comparative, à 44°, des phages staphylococciques H et Twort montre que ces deux phages font appel pour leur multiplication à des processus métaboliques distincts. En effet, la multiplication du phage H à 44° est totalement impossible, tandis qu'on peut entraîner le phage Twort à se multiplier et à lyser le germe sensible, à cette température.

On obtient par passages successifs un variant stable, le phage Twort/10, qui ne se distingue de la souche initiale que par son aptitude à se multiplier et à lyser le staphylocoque Twort à 44°. Ces différences de comportement sont spécifiques du phage, puisqu'en mélange dans la même culture du staphylocoque Twort, le phage H disparaît tandis que le phage Twort/10 se multiplie et provoque la lyse totale de la culture sensible en quelques heures.

La disparition du phage H à 44° pourrait être due à la mort des bactéries sensibles sur lesquelles il s'est fixé, mais nous avons vu qu'à condition de ne pas utiliser de quantités excessives de ce phage (76 700 phages pour 110 000 germes), les cultures des staphylocoques JB ou Twort se développent aussi rapidement en sa présence qu'en son absence.

Bien qu'en deux heures trente, 95 p. 100 du phage ait été inactivé, le nombre de bactéries viables est le même dans la culture contenant le phage et dans celle qui n'en contient pas. Aussi nous paraît-il difficile d'admettre, dans ces conditions, que la disparition du phage soit due à la mort des bactéries sensibles sur lesquelles il s'est fixé.

Nous pensons plutôt que l'inactivation du phage H à 44° est due à l'altération de certains processus de synthèse indispensables à la multiplication du phage.

Lorsque le rapport phage/bactéries est notablement plus élevé (100 phages pour 1 bactérie), il y a inactivation du phage et mort d'une forte proportion des bactéries sensibles, mais le nombre de phages inactivés n'est nullement proportionnel au nombre de germes tués : 1 000 000 de corpuscules et 33 000 germes environ disparaissent pendant la première heure d'incubation à 44° ; pendant les cinq heures qui suivent, il disparaît 2 150 000 phages et 195 germes par goutte.

L'action léthale, pour le germe sensible, de ce phage utilisé en grande quantité à 44°, est, pensons-nous, indépendante du phénomène de disparition, exactement comme le « killing effect » décrit par Andrewes et Elford est indépendant de la multiplication du phage à 37° : il peut y avoir inactivation du phage à 44°, sans mort des bactéries, comme il peut y avoir multiplication à 37° sans « killing effect ».

Le phage Twort au contraire, après un premier passage à 44° au cours duquel on ne décèle pas de multiplication bien qu'il y ait lyse partielle de la culture, est capable de se régénérer à cette température et de provoquer après quelques passages la lyse totale de la culture sensible.

L'addition d'extrait de viande au bouillon provoque une augmentation du phage Twort pendant les premières heures de l'incubation à 44°, augmentation suivie d'une chute de titre du phage qui en vingt-quatre heures est revenu à son taux initial. Il est vraisemblable qu'en bouillon ordinaire la multiplication étant plus lente est à tout moment compensée par la disparition d'un certain nombre de corpuscules.

L'extrait de viande qui accélère la multiplication du phage Twort et de son variant le phage Twort/10 à 37° et à 44° est complètement inactif à l'égard du phage H aux deux températures.

L'hydrolysate acide de caséine augmente la production du phage Twort à 44°, mais pas à 37°. Il augmente aussi, dans certains bouillons, l'action inhibitrice du phage H à 44° pour la culture sensible, mais sans toutefois influencer sa vitesse de disparition ; à 37°, il augmente légèrement sa multiplication.

Ceci montre que la spécificité de ces deux phages ne se limite pas à exiger pour leur fixation des récepteurs bactériens différents comme paraissent l'indiquer des recherches antérieures [2], mais qu'une fois fixés sur les bactéries sensibles, ils poursuivent leur régénération par des voies distinctes.

RÉSUMÉ.

1° Le phage staphylococcique H disparaît des cultures sensibles en voie de développement à 44°, tandis que, par passages succes-

sifs du phage Twort à cette température, on obtient un variant stable qui ne se distingue du phage initial que par son aptitude à se multiplier à 44°.

2° Utilisé en très grande quantité le phage H. à 44°, inhibe pendant plusieurs heures le développement de la culture sensible.

3° Certains facteurs, qui accélèrent la multiplication du phage Twort à 37° ou à 44°, sont sans action sur le comportement du phage H à ces deux températures.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. H. ANDREWES et W. J. ELFORD. *Brit. J. Exp. Path.*, 1932, **13**, 13.
- [2] M. P. BEUMER-JOCHMANS. *Ces Annales*, 1949, **76**, 263.
- [3] J. DIRKX. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31**, 719.
- [4] R. DOERR et W. GRUNINGER. *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1923, **97**, 209.
- [5] A. GRATIA. *Ces Annales*, 1936, **57**, 652.
- [6] R. LINZ. *Ces Annales*, 1948, **75**, 540.
- [7] W. PRICE. *J. Gen. Physiol.*, 1947-1948, **31**, 127.
- [8] W. PRICE. *J. Gen. Physiol.*, 1948-1949, **32**, 213.
- [9] Ph. M. ROUNTREE. *J. Gen. Microb.*, 1949, **3**, 164.
- [10] R. WAHL et J. JOSSE-GOICHOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 1225

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 1^{er} Mars 1951.

Présidence de M. GASTINEL.

NÉCROLOGIE

JOSEPH MAGROU

(1883-1951)

La Société Française de Microbiologie est aujourd'hui en deuil. Depuis notre dernière réunion, notre cher Collègue et Président sortant Joseph Magrou est décédé. Tous ceux qui ont connu l'homme et suivi l'œuvre de ce savant comprendront ce que représente sa perte pour ses amis et pour la science française. Ai-je à dire ici, dans cette maison où il a tant travaillé, comme chef du Service de Phyto-pathologie, tous les titres qu'il avait acquis par son labeur obstiné, toutes les recherches qu'il avait effectuées et dont le couronnement fut son entrée à l'Institut de France en 1945 ? Docteur ès sciences, Docteur en médecine, Maître de recherches du Centre National de la Recherche scientifique, il appartenait à la Maison de Pasteur depuis de longues années et y assumait l'enseignement de la Mycologie et de la Pathologie végétale au Cours Supérieur de Bactériologie.

Tous les biologistes connaissent ce que ses recherches ont apporté au grand problème de la symbiose entre plantes supérieures et champignons, ce qui devait amener à préciser les conditions de la tubérisation. Magrou établit en effet une corrélation entre la production des tubercules et la symbiose avec des champignons microscopiques radicaux. Les organismes saccharifient l'amidon contenu dans les racines et élèvent la concentration moléculaire du suc de la plante. Tout ceci devait conduire à une méthode de culture symbiotique de la pomme de terre pour en accroître le rendement et enrayer la propagation des maladies à virus. Dans ces toutes dernières années, Magrou a montré qu'une plante annuelle peut acquérir l'état vivace sous l'influence d'un facteur extrinsèque, tel que la symbiose avec des champignons présents dans la terre.

Cet ensemble de recherches conduisait à l'étude des réactions d'immunité cellulaire comparable à la phagocytose. D'autre part, Magrou observe que le suc des plantes inoculé avec *Bacterium tumefaciens*, agent du cancer, est doué de propriétés agglutinantes et précipitantes, analogues à celles observées dans les sérums des animaux préparés. Bien plus, et je ne saurais trop le souligner, Magrou constate, à côté des phénomènes immunitaires, des réactions à type d'hypersensibilité allergique, montrant comment les mêmes lois peuvent s'observer dans le règne animal et végétal. Il est impossible de suivre l'œuvre de Magrou dans ses travaux d'embryologie expérimentale et de morphologie bactérienne, notamment en ce qui concerne la structure des colonies du vibron cholérique. Un chapitre cependant doit être signalé dans la continuité si parfaite des préoccupations de Magrou, celui où il poursuit les recherches du botaniste Noël Bernard sur les graines d'orchidées qui ne peuvent germer que si certaines cellules de l'embryon sont envahies par le champignon symbiotique, vivant dans les racines d'orchidées adultes.

Mais je m'arrête là, car j'ai hâte de dire ce qu'était, à côté du savant, l'homme d'une exquise modestie que nous avons tous admiré, en lui vouant une profonde amitié. Magrou était toute finesse et délicate sensibilité. Sa haute culture l'avait porté tout particulièrement vers les études musicales. Il était compositeur et tenait les grandes orgues de la Chapelle du Val-de-Grâce. Il me disait un jour, avec quelle ferveur et quelle joie, il y passait de longs moments de solitude, l'église déserte, pour exprimer sur les claviers, dans une haute spiritualité chrétienne, tout ce qui s'élevait des profondeurs de son âme vers les sommets de sa méditation. Il a supporté stoïquement de longues années de souffrances qui n'abattaient point, cependant, ses courageux efforts. Vous avez tous vu, mes chers Collègues, ce qu'il était comme Président de notre Société, l'homme affable sachant dire, de sa voix un peu chantante du méridional né à Béziers, les mots qui conviennent.

Avec un tact parfait et une science étendue, il savait résumer une discussion et broser une synthèse. Mais par-dessus tout, son exquise courtoisie faisait de lui un Président inégalé. Je suis sûr d'être l'interprète de toute la Société en exprimant à Madame Magrou nos respectueuses condoléances et en l'assurant que le souvenir de Joseph Magrou demeurera très vivant parmi nous.

Je vous demande, mes chers Collègues, de bien vouloir observer debout, en sa mémoire, une minute de silence recueilli.

PRÉSENTATION D'OUVRAGES

M. LÉPINE : J'ai l'honneur d'offrir à la Société, au nom de MM. Limasset et Darpoux, la deuxième édition de leur ouvrage *Principes de Pathologie Végétale* (1).

(1) P. LIMASSET et H. DARPOUX, *Principes de Pathologie Végétale*, 2^e édition, Dunod, 92, rue Bonaparte, Paris-6^e, 1951, 334 pages, 148 figures. Prix : 1 880 fr.

La première édition, qui date de 1944, a été rapidement épuisée : c'est dire qu'elle répondait à un véritable besoin. Cette nouvelle édition revue et augmentée n'a rien perdu, en rajeunissant, des qualités de sa devancière.

Après quelques considérations sur l'historique de la pathologie végétale, les auteurs ont traité successivement les champignons et bactéries, les mycoses des végétaux, les maladies bactériennes, la lutte contre les maladies cryptogamiques des plantes par des agents physiques ou des produits chimiques, la lutte contre les maladies des plantes par des moyens biologiques, les maladies provoquées par les flagellés et les algues, les dégâts causés par les phanérogames parasites et enfin les maladies à virus des végétaux. Un chapitre de techniques de pathologie végétale et un appendice renfermant la bibliographie des ouvrages à consulter complètent utilement cet ensemble.

On ne saurait trop féliciter les auteurs des qualités qu'ils ont déployées dans leur livre, intéressant et agréable à consulter même pour le profane. Une exposition documentée mais dénuée de tout hermétisme, des illustrations particulièrement bien choisies et bien venues, donnent au texte une très grande accessibilité ; il n'en est pas pour cela élémentaire ni incomplet. Les acquisitions les plus récentes de la pathologie végétale et des méthodes scientifiques y sont rapportées avec l'ampleur et les précisions que méritent les questions.

Dans l'ensemble ce livre, recommandable à tous points de vue, présente à la fois un panorama détaillé de la pathologie végétale et le bilan de nos connaissances en cette science. Tout nous laisse penser que cette nouvelle édition connaîtra un succès plus vif encore que la précédente.

M. Lépine : Le professeur Claudio Fermi dont l'œuvre entière a été consacrée à l'étude du virus rabique et dont le nom est inséparable de l'une des plus précieuses acquisitions qui aient été faites depuis Pasteur, la préparation du vaccin antirabique phéniqué, couronne une existence laborieuse par un imposant monument : un traité de la rage en deux volumes : *La Rabbia* (1), que j'ai l'honneur de présenter en son nom.

Je sais, par la correspondance personnelle échangée avec le grand savant italien depuis des années, avec quelle minutie et quelle ardeur il a depuis longtemps accumulé des documents en vue de la rédaction de cet ouvrage : c'est un tableau complet des travaux expérimentaux, épidémiologiques et cliniques sur la rage qu'il nous apporte dans les quelques 1 350 pages de ce traité.

Le premier volume décrit la rage et sa diffusion dans le monde, la réceptivité de l'homme, la transmission naturelle de la rage aux animaux, et discute longuement dans un chapitre très documenté la question de la durée de l'incubation de la rage. Il expose tous les symptômes de la maladie ainsi que son diagnostic clinique, chez l'homme d'abord, chez l'animal ensuite.

(1) Professeur CLAUDIO FERMI, *La Rabbia*, 2 volumes, « Sclavo » Siena, 1 342 pages. Prix : L. 12 000.

L'anatomo-pathologie et la cytologie de la rage sont traitées à fond dans les chapitres qui suivent, ainsi que les voies d'inoculation chez l'animal, la symptomatologie, l'anatomie pathologique de la rage expérimentale. Après une revue des travaux des auteurs ayant participé à l'étude des lésions histopathologiques de la rage et des considérations sur la pathogénie des symptômes observés dans la maladie, l'auteur aborde au XIX^e chapitre l'étude du virus lui-même, qu'il envisage par rapport à la question des virus en général.

Après l'étude de la culture du virus rabique et celle des différentes souches classiques du virus (y compris celles du virus fixe de Sassari, illustrées par les recherches personnelles de l'auteur), leurs caractères physiques et l'influence exercée sur elles par différents agents, la question de la vaccination antirabique occupe la presque totalité du 2^e volume.

Toutes les méthodes connues ou proposées sont passées en revue ainsi que la question de la sérothérapie de la rage et sans oublier la vaccination, systématique ou après morsure, des chiens et des herbivores. Un dernier chapitre, enfin, traite des méthodes de police vétérinaire selon leurs applications à la lutte antirabique dans les principaux pays du monde.

Cet aperçu du contenu de l'ouvrage donne une idée de son importance et permet de comprendre qu'il est, à l'heure actuelle, sans équivalent au monde. Il contient une précieuse source de documentation qui en fera un outil indispensable de travail. Il est inévitable qu'un monument de cette importance renferme quelques erreurs ou quelques oublis de minime importance. On pourrait critiquer certains points du plan de l'ouvrage ou juger superfétatoires quelques pages de considérations générales sur les virus et les bactériophages. Ces critiques de détail restent sans portée devant le sentiment d'admiration qu'inspire l'imposant travail de l'auteur et les services incontestables qu'il est appelé à rendre tant par l'exposé complet de chacun des aspects de la question de la rage que par la bibliographie abondante de sa documentation.

COMMUNICATIONS

ÉTUDE D'UNE NOUVELLE ESPÈCE ANAÉROBIE DU GENRE *PASTEURELLA* : *P. SEROPHILA* n. sp.

par V. BOKKENHEUSER.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Les souches répondant aux espèces anaérobies du genre *Pasteurella* sont rares : depuis 1922, aucune n'a été rencontrée, alors que plusieurs milliers de souches anaérobies des autres genres ont été isolées et étudiées par le Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur.

En décembre 1950, le Dr Valentin, de Créteil, que nous remercions très vivement, nous a adressé le pus d'un abcès périanal observé chez

un jeune aveugle. De ce pus, nous avons isolé en culture pure une *Pasteurella* anaérobie sérophile dont voici la description :

HABITAT. — Vraisemblablement le tube digestif. Très rare.

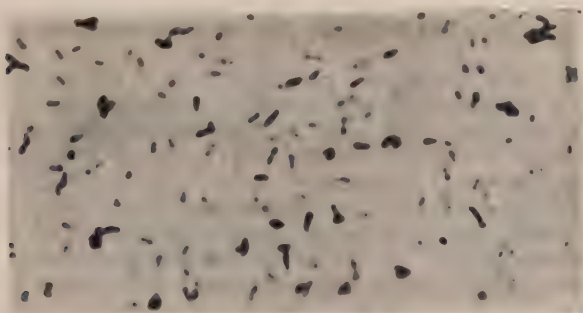


FIG. 1. — *Pasteurella serophila*. Gross. : $\times 1\ 000$.

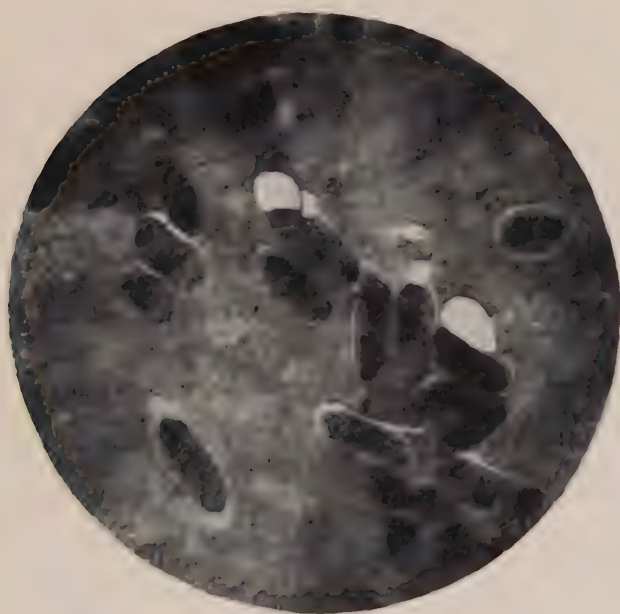


FIG. 2. — *Pasteurella serophila*.
Gross. : $\times 8\ 000$ (micr. électronique. Institut du Cancer, Villejuif.)

MORPHOLOGIE. — Bâtonnet asporulé, immobile, Gram-négatif, se présentant le plus souvent en navettes à coloration bipolaire dans les géloses profondes additionnées de sérum ; plus rares dans les bouillons.

Longueur 1,8 à 2 μ ; largeur 0,4 à 0,5 μ (fig. 1 et 2). On rencontre

parfois des formes géantes, ovales, mais jamais de filaments ni de sphéroïdes.

PHYSIOLOGIE. — Anaérobie très strict ; thermorésistance nulle ; sérophile obligatoire. Réducteur (rouge neutre et phénosafranine réduits). Longévité très brève (dix à quinze jours à température ordinaire).

CULTURES : Très faiblement gazogènes ; odeur sulfhydrique légère.

Gélose VF glucosée profonde + sérum : Colonies lenticulaires de 0,5 mm de diamètre apparaissant en vingt-quatre heures. Pas de gaz.

Eau peptonée + sérum : Culture très pauvre ; trouble léger, se déposant rapidement. Pas de gaz.

Bouillon VF glucosé + sérum : Culture lente, en trois à quatre jours ; si on transplante tous les jours on arrive à accélérer le développement en vingt-quatre heures ; c'est alors un trouble abondant se déposant très lentement. Le gaz ne se dégage jamais spontanément, mais si on imprime au tube de petits chocs répétés on provoque son dégagement, d'ailleurs toujours très faible.

Gélatine + sérum : Non liquéfiée.

Lait + sérum : Coagulé en trente heures. Légère rétraction du caillot et exsudation d'une petite quantité de lactosérum.

Protéines coagulées + sérum : Pas de digestion.

Glucides : Fermentation acide marquée du glucose, lactose, lévulose et saccharose, et moins marquée du maltose, galactose, amidon et glycérine.

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES. — Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites.

Les sulfites ne sont pas réduits en sulfures. La fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 produit SH_2 , NH_3 (0,24 g par litre) ; aldéhydes ; cétones ; indol ; scatol ; amines volatiles ; l'acidité volatile totale est de 1,65 g par litre ; elle est constituée par le mélange acétique propionique = 1/1. Pas d'acide fixe.

POUVOIR PATHOGÈNE. — Ayant été isolée en culture pure d'un abcès périanal, cette espèce doit être considérée, jusqu'à plus ample informé, comme un pyogène. Les cultures n'ont provoqué chez le cobaye et la souris aucune lésion expérimentale. Elles ne renfermaient ni toxine, ni hémolysine.

SYSTÉMATIQUE. — Les espèces *vulgata*, *ovata*, *convexa* et *coagulans*, qui ont été isolées en 1933 par Eggerth et Gagnon (1) de l'intestin humain et étiquetées *Bacteroides* par ces auteurs, ont été transférées par Prévot (2) en 1938 au genre *Pasteurella* après la démonstration de l'invalidité du terme *Bacteroides*. A part *P. vulgata*, assez fréquente (et que Prévot et Tardieux tendent (3) à considérer aujourd'hui plutôt

(1) EGGERTH et GAGNON, 1933, cités par WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT, *Les microbes anaérobies*, 1937, pages 772 et suivantes.

(2) A.-R. PRÉVOT, *Manuel de classification des anaérobies*. 1 vol., Masson, 1948 (2^e édition), pages 67 et suivantes.

(3) Communication orale.

comme une espèce de *Spherophorus*), les trois autres sont respectivement très rare, rare, très rare.

L'espèce que nous avons isolée et étudiée est très rare aussi. Elle se distingue facilement des espèces précitées par :

- 1° Sa sérophilie obligatoire ;
- 2° Ses cultures faiblement gazogènes ;
- 3° La non-liquéfaction de la gélatine ;
- 4° Le type fermentaire.

Il s'agit donc bien d'une espèce nouvelle pour laquelle nous proposons le nom de *Pasteurella serophila*.

LES DÉLAIS DE RÉPONSE DEMANDÉS PAR L'INOCULATION AU COBAYE DE PRODUITS SUSPECTS DE TUBERCULOSE

par F. TISON

(Sanatorium de Praz-Coutant, Haute-Savoie.)

La récente et remarquable monographie de Jean Desbordes [1] sur le « diagnostic des mycobactéries » met en vedette un point particulier. Il s'agit de la lecture de l'allergie du cobaye inoculé.

Une expérience de 3 400 inoculations avec 10 200 intradermo-réactions et 20 400 allergogrammes nous autorise à tirer quelques conclusions qui pourront inciter à certaines modifications techniques.

Toutes ces inoculations ont été faites sur des produits réputés paucibacillaires (généralement crachats recueillis directement ou par tubage gastrique). Toutes les ressources des examens optiques avaient été épuisées auparavant selon les principes de P.-E. Davy et J.-C. Levaditi [2].

Inoculation sous la peau de la cuisse gauche de 2 cm³ de produit non modifié.

Nous voudrions répondre ici à deux questions fréquemment posées :

1° L'allergie du cobaye à la tuberculine permet-elle une réponse définitive ?

2° Quel délai est nécessaire avant de sacrifier l'animal ?

1° *L'allergie du cobaye permet-elle une réponse définitive ?*

La plupart des auteurs, comme Desbordes, n'attendent de l'intradermo-réaction qu'une « indication », la confirmation ne pouvant être donnée que lors de l'autopsie du cobaye.

Certains rongeurs non spécifiques peuvent prêter à confusion si on emploie la tuberculine au 1/100 préconisée par Paraf [3]. P.-E. Davy et nous-même [4] avons déjà insisté sur ce fait.

Pour avoir une réaction plus nette nous employons la technique suivante :

Le flanc du cobaye est épilé par arrachement des poils, de préférence sur une partie de pelage clair, là où la peau n'est pas pigmentée.

L'intradermo-réaction est faite avec $1/10$ de cm^3 de tuberculine brute diluée au $1/10$.

La lecture est faite vingt-quatre heures et quarante-huit heures plus tard. Le calque de la réaction est reporté sur le cahier d'observations.

Trois éventualités peuvent se présenter :

- a) pas de réaction ;
- b) rougeur qui s'atténue le deuxième jour ;
- c) escarre franche au centre d'un halo inflammatoire, persistant ou s'aggravant le deuxième jour.

Seule cette troisième réaction est considérée comme positive étant donné la forte dose de tuberculine injectée.

Elle autorise alors une réponse positive au clinicien. Mais son absence n'autorise naturellement pas une réponse négative. Les intradermo-réactions sont pratiquées, en effet, *tous les trente jours* et il convient alors d'attendre la suivante.

Sur les 3 400 animaux inoculés, 1 126 ont été tuberculisés :

463 ont répondu à la première réaction, soit en moins de trente jours ;

608 ont répondu à la deuxième réaction, soit entre trente et un et soixante jours ;

54 ont répondu à la troisième réaction, soit après plus de soixante et un jours.

Pas une fois, il n'y a eu écart entre la réponse de l'allergie et le résultat de l'autopsie.

Selon cette technique, l'allergie du cobaye à la tuberculine permet une réponse définitive. Elle peut, dans les cas favorables, se manifester vers le vingtième jour, surtout si on emploie notre méthode d'inoculation [5].

Mais il faut attendre la troisième réaction mensuelle pour pouvoir être sûr de la négativité, sous peine de passer à côté de 4,7 p. 100 de résultats positifs.

2° Quel délai est nécessaire avant de sacrifier l'animal ?

Devant la lenteur de certaines réponses, on pourrait être tenté de sacrifier l'animal avant l'apparition de l'allergie. Il est classique de faire l'autopsie à la cinquième ou sixième semaine [4].

En fait, dans les cas où, seule la troisième intradermo-réaction s'est révélée positive, on aurait risqué, en sacrifiant l'animal plus tôt, de trouver des lésions trop minimes pour que leur caractère tuberculeux soit mis en évidence sans pratiquer la rétro-inoculation.

Il ne convient de tuer le cobaye à la cinquième semaine que si la réponse allergique a été nette et que si les adénopathies sont nettement perceptibles. On n'a pas le droit de conclure à une réponse négative si on n'a pas observé l'animal plus de trois mois.

Dans ces conditions, le frottis d'organes ou de pus ganglionnaire nous a *toujours* permis de mettre en évidence les bacilles acido-résistants dans les 1 126 cas où l'intradermo-réaction avait été positive.

Les cliniciens pour qui nous pratiquons ces examens connaissent parfaitement la signification des réponses mensuelles d'intradermo-réaction et peuvent tirer des conclusions nuancées selon la précocité de la réponse allergique ; la description des lésions à l'autopsie leur vient régulièrement en confirmation.

En traitant le produit à inoculer [5], on raccourcit la période anté-allergique de 20 p. 100, on augmente la sensibilité de 30 p. 100. Faite dans certaines conditions, l'intradermo-réaction permet une réponse définitive, ce qui supprime l'inconvénient d'une observation de plus de trois mois avant de sacrifier l'animal.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MASSON, éditeur, Paris, 1951.
- [2] P.-E. DAVY et J.-C. LEVADITI. Ces *Annales*, 1938, **61**, 100.
- [3] PARAF. *La tuberculose du cobaye*. Masson, Paris, 1939.
- [4] P.-E. DAVY et F. TISON. *Rev. Tub.*, 1949, **13**, 761.
- [5] F. TISON. Ces *Annales*, 1950, **79**, 225.

RECHERCHES SUR LA THERMORÉSISTANCE DE *CL. SPOROGENES* ET LE PHÉNOMÈNE D'ENTRAÎNEMENT DES ESPÈCES PEU RÉSISTANTES

par A.-R. PRÉVOT, M. RAYNAUD et H. TATAKI.

(*Institut Pasteur. Service des Anaérobies.*)

Les données classiques assignent comme thermo-résistance habituelle à *Cl. sporogenes* la durée minimum de une heure à l'ébullition [1].

Ayant eu l'occasion d'étudier depuis une dizaine d'années 54 souches de *Cl. sporogenes*, nous avons eu la surprise de constater l'insuffisance de cette assertion et la nécessité de reconsidérer cette donnée importante.

ORIGINE DE NOS SOUCHES. — Sur les 54 souches étudiées, 22 provenaient du sol (9 de terres arables et boues fluviales et lacustres de France, 13 des mêmes habitats africains : Sénégal, Guinée, Côte d'Ivoire) ; 11 provenaient de gangrènes gazeuses (dont 7 isolées chez des soldats américains blessés en France en 1944, et 4 de gangrènes diverses chez des civils français) ; 10 provenaient de boîtes de conserves infectées (dont 3 nous ont été envoyées par le professeur J. Meyer, de Strasbourg, et 7 par V. Aschehoug, directeur du Laboratoire de Recherches bactériologiques de l'Industrie des Conserves à Stavanger, Norvège). Nous remercions très vivement MM. J. Meyer et Aschehoug de nous avoir adressé leurs souches.

Enfin, 11 autres provenaient de sources diverses.

TECHNIQUE EMPLOYÉE. — C'est à partir de cultures âgées de cinq jours au moins en bouillon VF glucosé à 2 p. 1 000 que nous ensemençons des tubes de Hall du même milieu, préalablement désaérés par ébullition, ensemencés à 100° et remis aussitôt dans le bain-marie à 100° pendant des temps divers évalués au chronomètre. Les tubes contenant des spores ayant résisté à la durée de l'ébullition sont placés à 37° et

donnent dans les vingt-quatre à quarante-huit heures des cultures abondantes.

RÉSULTATS. — Nous avons constaté : 1° que 35 souches ne résistaient pas plus de quinze minutes à l'ébullition. Parmi elles, 17 souches du sol, 11 souches de la gangrène et 7 souches de provenances diverses.

2° 7 souches résistaient de quinze à cinquante minutes à l'ébullition (dont 3 provenaient du sol et 4 d'habitats divers).

3° Une souche résistait une heure à 100° (provenant des boues thermales de Dax).

4° 11 souches avaient une thermorésistance égale ou supérieure à six heures à 100°. Cette donnée est absolument nouvelle et nous avons hésité très longtemps à poser l'étiquette de *Cl. sporogenes* sur ces souches. Ce n'est qu'après avoir longuement étudié la situation de leur spore, nettement subterminale (par conséquent éliminant le diagnostic de *Plectridium caloritolerans*, qui est la seule espèce anaérobie non pathogène signalée comme résistant plusieurs heures à l'ébullition) et leurs caractères cultureux biochimiques et immunologiques, répondant exactement à la description classique de *Cl. sporogenes*, que nous avons conclu qu'il s'agissait bien de cette espèce (leur absence totale de pouvoir toxigène et leur putridité intense les distinguaient en particulier de *Cl. botulinum*, dont certaines souches en conditions spéciales résistent plusieurs heures à 100°).

Parmi ces 11 souches, 2 résistaient six heures à 100°, 8, huit heures à 100° et une, huit heures trente à 100°.

Ces dernières souches provenaient de boîtes de conserves. Elles étaient donc sélectionnées du fait même qu'elles avaient résisté à la stérilisation de celles-ci. Expérimentalement, elles résistaient également de quinze à soixante minutes à 110°, et même cinq à dix minutes à 115°, suivant les souches.

INDIVIDUALISATION DES SOUCHES HAUTEMENT THERMORÉSISTANTES. — Ce caractère surprenant de thermorésistance très élevée chez de nombreuses souches de *Cl. sporogenes* jusqu'ici jamais signalé, nous incite à individualiser ces souches en une variété physiologique nouvelle pour les distinguer de la masse des souches répondant à l'espèce-type et ne résistant pas plus d'une heure à 100°. La majorité de ces souches ayant été isolées au laboratoire de Stavanger, nous proposons de les nommer *Cl. sporogenes* var. *stavangerensis*, nv. var.

Jusqu'ici nous n'avons pas trouvé à cette variété de caractères différentiels autres que cette thermorésistance anormalement élevée, mais il n'est pas exclu de penser que d'autres caractères puissent ultérieurement être décrits.

A noter que le temps maximum de huit heures trente est le même que celui qui a été trouvé par Meyer et Lang pour *Pl. caloritolerans* et il semble que ce soit l'extrême limite de résistance des spores bactériennes, aucun auteur n'ayant jamais signalé de bactéries plus résistantes.

RECHERCHES SUR LE PHÉNOMÈNE D'ENTRAÎNEMENT. — En 1926, Meyer et Lang ont décrit un anaérobie hautement résistant : *Plectridium*

caloritolerans, qui survit à un chauffage de cinq cent dix minutes à 100°. Or, quand on associe *Pl. caloritolerans* à *Cl. bolulinum*, ce dernier voit sa thermorésistance passer de trois cent soixante minutes (maximum) à quatre cent soixante-dix minutes d'ébullition [2].

Ne possédant pas de souches de *Pl. caloritolerans* dans notre collection, nous n'avons pas pu vérifier cette expérience ni en chercher le mécanisme. Aussi nous sommes-nous servi de la souche 333 de *Cl. sporogenes* qui résiste huit heures trente à 100° pour essayer d'entraîner un autre anaérobie : *Welchia perfringens*, souche Mayer, dont la résistance maximum est de trois minutes à 100°.

Voici les résultats de nos expériences, où chaque résultat a été obtenu sur 5 tubes de Hall de bouillon VF glucosé à 2 p. 1 000, pH 7,4.

Si on laisse les cultures des deux anaérobies en contact pendant quinze minutes, *W. perfringens* ne subit pas d'entraînement à la résistance thermique. Après un contact de trente minutes, il résiste cinq minutes à 100°.

Après un contact d'une heure entre les deux cultures, *W. perfringens* peut résister trente minutes à 100°, mais il ne résiste pas quarante minutes. Si le contact est plus long (deux heures à vingt-quatre heures), la thermorésistance est toujours de trente minutes et ne peut pas être dépassée.

A noter qu'une souche entraînée ayant résisté trente minutes après contact perd aussitôt cette thermorésistance dès qu'elle n'est plus en contact avec la souche entraînante.

Si nous répétons les mêmes expériences avec *Cl. fallax*, souche Tracol, nous ne voyons aucune augmentation de la thermorésistance. Le phénomène d'entraînement n'est donc pas un phénomène général, mais il n'est pas non plus localisé aux deux espèces étudiées par Meyer et Lang.

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DU PHÉNOMÈNE D'ENTRAÎNEMENT. — Quelle est la substance qui, dans la culture de *Cl. sporogenes* 333, provoque l'augmentation de la thermorésistance de *W. perfringens* Mayer ?

Nous avons d'abord séparé les corps microbiens de *Cl. sporogenes* par centrifugation et lavage et mis en contact pendant une heure des cultures de *W. perfringens* Mayer séparément avec les corps microbiens d'une part, et le liquide clair surnageant d'autre part.

Le contact d'une heure avec les corps microbiens lavés provoque la même augmentation de la thermorésistance et la porte à trente minutes.

Le contact d'une heure avec le surnageant l'augmente aussi, mais un peu moins : vingt minutes.

Ainsi, la substance responsable de ce phénomène d'entraînement existe dans les corps microbiens et diffuse dans le milieu.

Pour essayer de discerner à quel groupe de corps elle appartient, nous avons fait quelques investigations :

1° Les corps microbiens de *Cl. sporogenes* traités par la méthode de Raynaud [3] donnent des extraits qui, après dialyse, n'augmentent pas la thermorésistance de *W. perfringens*.

2° Nous avons cherché à précipiter, à partir d'un filtrat de *Cl. sporogenes* qui a provoqué le phénomène d'entraînement, une substance

active : les précipités obtenus par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à saturation, par l'éthanol (2 volumes), par le méthanol (2 volumes), se sont montrés incapables d'augmenter la thermorésistance de *W. perfringens*.

Il est possible que les souches thermorésistantes de *Cl. sporogenes* sécrètent une substance qui enveloppe les spores et les protège contre les effets du chauffage ou qui est adsorbée sur les spores et leur confère une plus grande résistance. Cette substance peut se fixer sur d'autres espèces sporulées et leur conférer temporairement une thermorésistance plus élevée que la leur propre, sans qu'elles acquièrent pour autant la propriété de la produire. La nature chimique de cette substance reste à déterminer.

CONCLUSIONS. — 1° La notion classique que *Cl. sporogenes* résiste en moyenne une heure à l'ébullition est fausse.

2° Sur 54 souches étudiées dont 22 provenaient du sol, 11 de gangrènes gazeuses, 10 de conserves infectées et 11 de divers habitats, nous n'avons trouvé qu'une seule souche dont la thermorésistance était d'une heure à 100°.

3° Sur les 42 souches dont la thermorésistance est inférieure à cette durée, 35 ne résistaient pas plus de quinze minutes à 100° et 7 résistaient de vingt à cinquante minutes à 100°.

4° 11 souches avaient une thermorésistance dépassant six heures à 100°. Parmi ces 11 souches figurent toutes celles qui ont été isolées de conserves infectées (10) et une provenant d'une péritonite. Sur ce total, 9 résistaient de huit heures à huit heures trente à 100° ; quinze minutes à 110° et cinq minutes à 115°.

5° Nous devons désormais considérer comme normales et répondant à l'espèce-type toutes les souches de *Cl. sporogenes* résistant moins d'une heure à 100° et considérer les souches hautement thermorésistantes comme une variété physiologique : *Cl. sporogenes* var. *stavangerensis*.

6° Le contact entre les cultures de *Cl. sporogenes* var. *stavangerensis* et de *W. perfringens* pendant une heure entraîne ce dernier à résister trente minutes à 100°, alors que sa résistance normale est de trois minutes.

7° La substance responsable de ce phénomène d'entraînement se trouve dans les corps microbiens et diffuse dans les cultures.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, 1937, 345.
- [2] Cité par WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, 304.
- [3] M. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 543.

SUR LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DE *PASTEURELLA TULARENSIS*

par G. GIRARD et J. GALLUT.

(Institut Pasteur.)

De récentes recherches ont apporté les premières données sur la constitution antigénique de l'agent étiologique de la tularémie. Au laboratoire de Lee Foshay, à Cincinnati, P. S. Nicholes [1], en soumettant, après dessiccation, d'importantes quantités de *P. tularensis* cultivées en milieu liquide à la digestion trypsique ou à l'extraction phénolique, a obtenu plusieurs fractions dont l'une s'est révélée antigénique. Il a aussi reconnu que les filtrats de culture ne contenaient aucun antigène décelable provenant d'un processus d'autolyse du microorganisme. La fraction antigénique isolée par Nicholes a fait, de sa part, l'objet d'une étude immuno-chimique très détaillée et conduit à une application pour une réaction de fixation qui s'avérait difficile avec le microbe total dont le pouvoir anticomplémentaire était très élevé.

Par ailleurs, M. Alexander [2], par le procédé d'extraction phénolique de Palmer et Gerlouch a isolé une fraction polysidique qui permet, à l'aide d'une réaction de précipitation effectuée sur le sérum, de mesurer le degré d'immunité après vaccination ou atteinte naturelle de tularémie. Le principe est celui préconisé par Heidelberger et coll. pour le titrage des anticorps sériques vis-à-vis des polysides du pneumocoque ou du méningocoque.

Enfin, on relève dans un article d'ensemble de L. Foshay [3] sur la tularémie que les filtrats de culture en milieu liquide de *P. tularensis* sont dénués de toxicité.

Le point de vue auquel nous nous sommes placés diffère de celui des auteurs précités. Nous avons voulu seulement rechercher si, dans le groupe des *Pasteurella* auquel on tend à rattacher l'agent de la tularémie, celui-ci se rapprochait, par l'existence ou l'absence d'un antigène complet (Boivin), de *Pasteurella sensu stricto* qui contient ce principe [4] ou de *P. pestis* et *P. pseudotuberculosis* qui en sont dépourvues [5]. D'autre part, était-il possible de mettre en évidence chez *P. tularensis* un principe toxique que l'on sait présent chez *P. avicida* et *P. pestis*, tandis qu'il est très exceptionnel chez *P. pseudotuberculosis* [6] ?

Nos investigations ont porté sur deux souches isolées depuis deux ans en France, l'une de l'homme (souche L), l'autre d'un lièvre (souche C), toutes deux hautement virulentes, mortelles pour la souris à la dose voisine de l'unité. Elles se sont comportées dans nos expériences de façon identique.

1° PRÉSENCE D'UN ANTIGÈNE COMPLET (BOIVIN), NON TOXIQUE, CHEZ *P. tularensis*. — Des cultures de trois jours de *P. tularensis* (souche L) sur milieu de Francis et en tubes de Legroux (poids à l'état frais, 1 708 g) sont, après lavage à l'eau physiologique, traitées par la technique de Boivin à l'acide trichloracétique. L'extrait, très opalescent, est dialysé contre eau courante, puis eau distillée, et précipité par addition de 8 volumes d'alcool à 96°. Le précipité après lavage à l'acétone et l'éther se présente sous l'aspect d'une poudre blanchâtre. Repris par 100 cm³ d'eau physiologique, il s'y dissout rapidement en totalité en donnant une solution colloïdale opalescente, mais parfaitement stable. Cet extrait purifié ne donne aucune réaction des protéines, mais une réaction de Molisch positive. Il précipite spécifiquement avec un sérum de tularémique à la dilution de 1/200.

L'extrait a été injecté à 3 lapins par voie intraveineuse à doses croissantes (4 doses réparties sur douze jours) sans provoquer aucun trouble ni amaigrissement. Le sérum de ces lapins, prélevé dix jours après la dernière injection, précipitait à 1/200 l'extrait purifié et agglutinait à 1/500 la suspension de *P. tularensis* utilisée pour le séro-diagnostic de la tularémie. A noter que le sérum de deux de ces lapins donnait une agglutination croisée à 1/50 et 1/10 avec *Br. abortus suis*, ce qui est courant pour les sérums tularémiques [7].

Une deuxième préparation d'antigène à partir de la souche C nous a fourni un extrait qui s'est comporté chimiquement et sérologiquement comme le précédent.

Des essais de toxicité se sont montrés négatifs. Deux lots de souris ont reçu par voie péritonéale des doses variables d'extrait trichloracétique purifié, la plus faible correspondant à 1,7 mg de microbes frais, la plus forte à 17 mg. Tous ces animaux sont restés indemnes.

La sensibilité cutanée du lapin normal vis-à-vis de cet antigène a été éprouvée suivant les modalités du test utilisé par G. Larson [8]. Injectée dans le derme du flanc, après épilation, une dose d'extrait correspondant à 42,5 mg de microbe frais n'a produit qu'une papule modérée disparaissant en moins de soixante-douze heures.

2° ABSENCE DE PRINCIPE TOXIQUE DANS LES EXTRAITS TOTAUX MICROBIENS. — Des cultures de trois jours de *P. tularensis* sur milieu de Francis au sang de lapin d'un côté, à l'extrait globulaire de l'autre, sont récoltées sur 14 boîtes de Legroux et mises en suspension en eau distillée (10 cm³ par boîte). Ce matériel est soumis à trois congélations et décongélations successives suivant le procédé Gory-Grasset. On obtient un extrait très trouble que la centrifugation n'éclaircit qu'à peine. Les germes ne sont pas tous tués, comme le prouve l'inoculation à la souris qui succombe en quarante-huit heures de septicémie tularémique. Une portion de l'extrait est recouverte de toluol et stérile après trois jours. Une autre est filtrée sur L3. 6 souris injectées par voie péritonéale avec chacun de ces extraits, 2 avec 1/20, 2 avec 3/10, 2 avec 5/10 de centimètre cube restent indemnes.

Dans des conditions expérimentales identiques, les extraits de *P. pestis* tuent toujours la souris à la dose de 1/10 au moins. Nous savons aussi que la souris supporte sans dommage de fortes doses de

P. tularensis tuée par chauffage, tandis qu'aux mêmes doses *P. pestis* la tue par intoxication.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — La présence d'un antigène complet (Boivin) sépare *P. tularensis* de *P. pestis* et *P. pseudotuberculosis* et la rapproche du microbe type du genre *Pasteurella*, *P. avicida*. L'absence de toxicité pour la souris de ce complexe est un fait intéressant, unique croyons-nous, jusqu'à présent, et que confirme la non-toxicité des extraits totaux de ce microorganisme. Si le terme d'endotoxine usité pour désigner l'antigène O complet des germes Gram-négatif, *Salmonelles* et autres, se conçoit puisque ce complexe antigénique est pathogène, il ne saurait convenir à un extrait microbien qui ne l'est pas. Les réactions que les extraits de *P. tularensis* provoquent sont essentiellement de nature allergique comme l'a bien montré Lavergne. La « tularine » n'est donc pas une endotoxine au sens littéral du mot.

Ces conclusions n'infirment en rien celles des auteurs qui, comme H. Drieux et coll. [9], attribuent à une toxine fortement nécrosante les lésions constatées à l'examen histo-pathologique des organes des animaux infectés expérimentalement. Un raisonnement analogue est aussi bien valable pour la pseudo-tuberculose, comme nous l'avons fait remarquer ailleurs [6] ; le comportement *in vitro* et *in vivo* d'un germe pathogène n'est pas nécessairement identique.

RÉSUMÉ. — On a mis en évidence, chez *Pasteurella tularensis*, la présence d'un antigène complet, type Boivin, qui est atoxique. Les extraits totaux du microbe sont eux-mêmes dépourvus de toxicité (*).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. S. NICHOLS. Unpublished Ph. D. Thesis. Univ. Cincinnati, 1946.
- [2] M. ALEXANDER. *J. exp. Med.*, 1950, **92**, 51.
- [3] L. FOSHAY. *Annual Rev. Microb.*, 1950, **4**, 315.
- [4] I. PIROWSKY. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 98.
- [5] G. GIRARD. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1577.
- [6] G. GIRARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 33.
- [7] G. GIRARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 359.
- [8] G. LARSON. *Publ. Health Reports*, 1946, **61**, 1797.
- [9] H. DRIEUX, R. PAILLE et G. THIERY. *Rec. Méd. vét. Ecole Alfort*, 1949, **123**, 816.

(*) Que le Dr Lee Foshay, qui a bien voulu nous adresser en communication la thèse de son élève P. S. Nicholes, travail non publié, veuille bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude.

L'ACTION DE L'AURÉOMYCINE SUR LA CULTURE D'UN STAPHYLOCOQUE OBSERVÉE AU MICROBIOPHOTOMÈTRE

par EWALD EDLINGER et MICHEL FAGUET.

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

L'étude de la sensibilité à l'auréomycine des différents microorganismes montre de très grandes différences selon les auteurs. Paine et coll. [1] indiquent que la concentration bactériostatique est de 1 à 2 μg par centimètre cube pour le staphylocoque. Pour Price et coll. [2], cette dose est de 0,09-25 μg par centimètre cube. Bryer et coll. [3] ont constaté que 0,6 μg par centimètre cube d'auréomycine inhibait le staphylocoque. Lankford et Lacy [4] utilisent une méthode turbidimétrique : la concentration inhibant la croissance dans la proportion de 50 p. 100, est, en dix-huit heures, pour la souche la plus sensible, de 0,012 μg et pour la plus résistante de 0,033 μg par centimètre cube. Beigelmann [5] recherche les causes de ces divergences et obtient des résultats sensiblement comparables à ceux de Lankford et Lacy [4]. Il attire l'attention sur le moment de la lecture qui serait responsable du désaccord. Chandler et Bliss [6], Bliss et Chandler [7]. Bliss et Todd [8] signalent que l'action de l'auréomycine n'est que transitoire. A une courte période de bactériostase succéderait une nouvelle phase de croissance. Il s'ensuit que le temps d'observation est d'une très grande importance. Mais les auteurs qui utilisent la méthode des cylindres sur boîte de gélose ne peuvent obtenir un résultat visible qu'après l'apparition d'un gazon bactérien suffisant.

A ce moment la nouvelle croissance est déjà amorcée. Donc, la méthode des dilutions est généralement préférable, surtout lorsqu'on utilise un appareil à mesurer la turbidité. Cependant, tous les auteurs cités constatent une période bactériostatique à la suite de l'introduction de l'antibiotique dans la culture bactérienne. Pour expliquer l'apparition de la nouvelle croissance, plusieurs hypothèses sont avancées : apparition d'une culture résistante, mais surtout destruction de l'antibiotique qui est très sensible à la réaction alcaline du milieu et aux températures élevées (Dornbush et coll. [9], Aitoff [10], Henneberg et Waterstrass [11]).

Cependant, les observations faites dans un autre but (Faguet et Edlinger [12] nous avaient conduits à penser que le microbiophotomètre de M. Faguet [13], par son enregistrement continu des densités optiques, devait se prêter d'une manière particulièrement adéquate à l'observation des phénomènes qui se produisent lorsque l'auréomycine est ajoutée à une culture bactérienne.

Expériences : Les 6 cuves de l'appareil reçoivent chacune 20 cm³ d'eau peptonée (à 1 p. 100 de peptone UCLAF et 0,1 p. 100 de glucose) préalablement ensemencée avec environ 500 000 germes par centimètre cube provenant d'une culture de dix-huit heures de staphylocoque Twort sur gélose inclinée, à 37° C.

L'auréomycine utilisée dans nos expériences provenait d'échantillons commerciaux (auréomycine Lederlé) en ampoule contenant 100 mg de

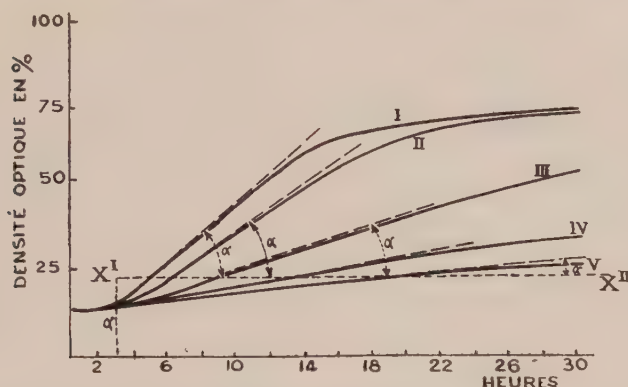


FIG. 1. — Enregistrement au microbiophotomètre. — Courbe I, croissance du témoin. Les courbes II-V représentent la culture sous l'influence respective de 0,01, 0,1 et 10 μg d'auréomycine par centimètre cube. α , ordonnée de $X'X''$. En pointillé, les tangentes.

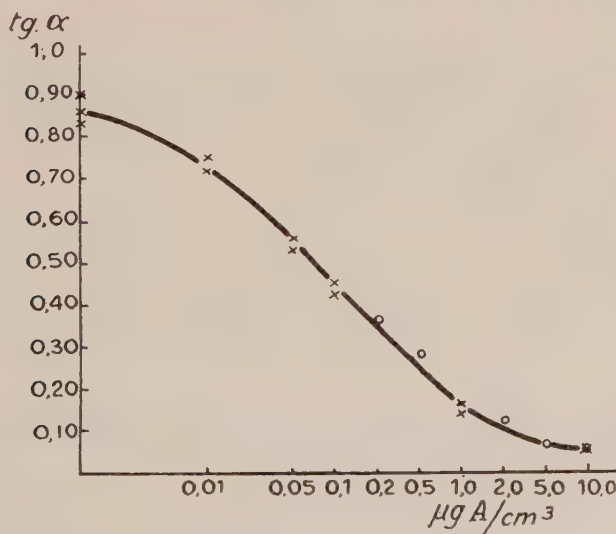


FIG. 2. — En ordonnées, les valeurs des tangentes α , en abscisses, les concentrations en auréomycine en notation semi-logarithmique. x représente trois expériences identiques, o une seule expérience.

poudre ; nous avons dilué cette quantité dans 100 cm^3 d'eau bidistillée stérile. Cette solution-mère et les dilutions appropriées à nos expé-

riences étaient conservées à la glacière et n'étaient utilisées que pendant quinze jours.

Des 6 cuves de l'appareil, une était réservée à la culture-témoin. Les autres recevaient différentes quantités d'auréomycine.

Résultat des expériences : La figure 1 montre une partie de ces expériences. La courbe 1 représente les changements de la densité optique au cours de la croissance. A une courte phase de latence succède la phase exponentielle à laquelle fait suite la phase d'arrêt de la croissance. Les cuves 2, 3, 4 et 5 ont reçu respectivement 0,01, 0,1, 1 et 10 μ g d'auréomycine par centimètre cube. Les courbes correspondantes montrent une phase de latence d'une durée sensiblement égale à celle de la courbe de la culture témoin, mais ensuite, la densité optique n'augmente qu'à un rythme beaucoup plus lent. Les maxima sont plus bas que le maximum du témoin. En traçant pour chaque courbe la tangente correspondant à des points situés sur une droite parallèle à l'axe des abscisses et se trouvant à une distance a de cet axe, et en calculant les valeurs respectives de ces tangentes, on constate que ces valeurs varient régulièrement avec la concentration en auréomycine.

Nous avons ainsi mesuré l'angle α obtenu dans toutes nos expériences. Les résultats sont représentés sur la figure 2. En ordonnées figurent les valeurs des tangentes α , en abscisses les concentrations en auréomycine en notation semi-logarithmique. Les valeurs s'échelonnent sur une courbe d'allure régulière.

Discussion. — Nos expériences sont en contradiction avec les résultats obtenus par les auteurs cités plus haut : nous n'avons pas retrouvé la phase bactériostatique de l'auréomycine précédant l'apparition d'une nouvelle croissance qu'ils ont décrite. Nous avons constaté que la culture microbienne présentait une croissance continue. Cette croissance est moins active et n'atteint pas le même degré de turbidité que la culture non traitée par l'antibiotique.

Nous croyons que cette divergence essentielle est due aux différences des méthodes utilisées, tandis que les autres auteurs ne font qu'une lecture turbidimétrique à un temps donné ou, dans le cas le plus favorable, à des intervalles de deux à quatre heures (Beigelmann [5]). nous avons enregistré, grâce au microbiophotomètre, le développement continu de la culture. Ainsi, nous avons pu constater l'élévation continue de la courbe de croissance et l'influence de la concentration en auréomycine sur le niveau atteint.

De cette constatation, nous nous croyons autorisés à suggérer l'utilisation du microbiophotomètre comme méthode de titrage de l'auréomycine.

D'autre part, pour expliquer le mode d'action de l'antibiotique, nous proposons l'hypothèse suivante : avec les doses étudiées, l'auréomycine ne produit pas d'action bactériostatique ou bactéricide, mais elle semble intervenir dans la croissance et dans la division de la cellule bactérienne en les diminuant d'autant plus fortement que la concentration est plus élevée.

L'action nocive de l'auréomycine pour les bactéries doit être intimement liée à la reproduction bactérienne.

Résumé. — Les observations au microbiophotomètre ont permis de montrer que l'auréomycine ralentit la phase exponentielle d'une

culture bactérienne. Le ralentissement est proportionnel aux concentrations en antibiotique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] T. F. PAINE, H. S. COLLINS et M. FINLAND. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1948, **51**, 228.
- [2] C. W. PRICE, W. A. RANDALL et H. WELCH. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1948, **51**, 211.
- [3] M. S. BRYER, E. B. SCHOENBACH, C. A. CHANDLER, E. A. BLISS et P. M. LONG. *J. Am. med. Assoc.*, 1948, **438**, 117.
- [4] C. E. LANKFORD et M. LACY. *Texas Rep. Biol. Med.*, 1949, **7**, 111.
- [5] P. M. BEIGELMANN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **72**, 89.
- [6] C. A. CHANDLER et E. A. BLISS. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1948, **51**, 221.
- [7] E. A. BLISS et C. A. CHANDLER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1948, **69**, 467.
- [8] E. A. BLISS et P. H. TODD. *J. Bact.*, 1949, **58**, 61.
- [9] A. C. DORN BUSH et E. J. PELCAK. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1948, **51**, 175.
- [10] M. AITOFF. *Ces Annales*, 1950, **79**, 222.
- [11] G. HENNEBERG et W. WATERSTRASST. *Zentralbl. Bakt.*, 1950, **156**, 258.
- [12] M. FAGUET et E. EDLINGER. *Ces Annales*, 1951, **80**, 281.
- [13] M. FAGUET. *Act. Sci. et Ind.*, Hermann, édit., Paris, 1941, 102 pages.

CARACTÈRES BIOLOGIQUES DES STAPHYLOCOQUES ISOLÉS D'INTOXICATIONS ALIMENTAIRES ET MÉTHODES DE DÉTECTION DE L'ENTÉROTOXINE STAPHYLOCOCCIQUE

par P. MERCIER, J. PILLET, M^{me} P. CHABANIÈR et M^{me} B. ORTA.

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

Nous avons pu disposer (1) de 10 souches de staphylocoques isolées d'intoxications alimentaires. Celles-ci se sont produites récemment dans la région parisienne, à la suite de l'ingestion de conserves de sardines, de pâté et de rillettes. Laissant volontairement de côté les aspects cliniques et épidémiologiques des intoxications alimentaires provoquées par le staphylocoque, nous avons centré notre étude sur les caractères biologiques de ces souches.

Pigment. — Les 10 souches prélevées sur les produits alimentaires contaminés étaient toutes dorées, mais nous rappellerons une fois

(1) Grâce à l'obligeance du professeur Boyer et de M^{lle} le Dr Corre, que nous remercions très vivement.

encore que le pouvoir chromogène du staphylocoque n'est pas un critère fidèle et précis de pathogénèse.

Fermentation du mannitol. — Le milieu de Chapman modifié, contenant 10 p. 1000 de mannitol et un indicateur de réaction, a viré en moins de vingt-quatre heures avec chacune des souches.

Elaboration de coagulase. — Les 10 souches ensemencées en bouillon nutritif ont engendré la coagulation totale du plasma de lapin en une heure trente pour 7 souches et en deux heures pour les 3 autres.

Production d'hémolysines. — Chaque souche a été ensemencée à la fois sur gélose au sang de lapin et sur gélose au sang de mouton. Sur les 10 souches, 2 élaboraient à la fois les hémolysines α et β ; les 8 autres ne sécrétaient que l'hémolysine α .

Production de toxine α . — L'une des souches (n° 12), ensemencée sur milieu de digestion papaïnique et cultivée en atmosphère enrichie en CO_2 durant une semaine, a produit une α -toxine dont la dose-test hémolytique était de 0,10 cm^3 . Deux autres, dans les mêmes conditions, ont élaboré une toxine dont la dose-test hémolytique était de 0,30 cm^3 .

L'ensemble de ces examens confirme une fois de plus que la coagulase, la fermentation du mannitol et la production d'hémolysines constituent les meilleurs tests du pouvoir pathogène du staphylocoque [4].

PRODUCTION ET MISE EN ÉVIDENCE DE L'ENTÉROTOXINE STAPHYLOCOCCIQUE.

— Parmi les 10 souches, 3 ont été retenues pour rechercher leurs propriétés entérototoxiques. L'une d'elles (n° 12) a été cultivée en milieu liquide pendant une semaine à 37°. Les 2 autres (n°s 54 et 55) furent ensemencées en milieu semi-solide de Dolman et cultivées pendant trois jours à 37°. Dans tous les cas, les cultures furent effectuées en atmosphère contenant 20 p. 100 de CO_2 . Après centrifugation prolongée, le liquide surnageant fut divisé en deux fractions. Dans l'une d'elles, nous avons recherché les hémolysines produites. Les résultats de cet examen ont été donnés plus haut.

L'autre fraction fut chauffée à l'ébullition durant vingt minutes pour détruire les hémolysines. Le centrifugat chauffé, totalement dépourvu d'hémolysines, ainsi que nous l'avons vérifié, fut alors injecté soit au jeune chat par voie veineuse, soit à la grenouille par voie parentérale dans le sac lymphatique dorsal (2).

Chez le jeune chat, d'un poids moyen de 1 kg, nous avons noté l'apparition des premiers troubles une heure trente après l'injection de 1 cm^3 du centrifugat chauffé : nausées, contractions violentes de la musculature abdominale, vomissements et défécations fréquentes, alors qu'un animal témoin, injecté dans les mêmes conditions avec un bouillon du lot ayant servi à la culture, est demeuré indemne. Chez le chat malade, les troubles ont régressé rapidement et après vingt-quatre heures l'animal ne présentait plus de symptôme morbide.

Les grenouilles (*Rana viridis* et *Rana fusca*) injectées avec le centrifugat chauffé ont réagi dans les cinq premières minutes qui ont suivi l'injection et ont présenté des troubles à peu près semblables à ceux

(2) Nous remercions nos collègues, les Drs Comandon et Girard, de leurs conseils techniques.

décrits récemment par Robinton [2] : immobilité de l'animal, protrusion des globes oculaires, bâillements, rejet de mucus, turgescence des glandes à mucus cutanées, membres antérieurs en extension, membres postérieurs soulevés de telle manière que le corps de la grenouille se place parallèlement au fond de l'aquarium. Des animaux témoins, injectés avec le bouillon non ensemencé et avec le filtrat chauffé à 100° d'une souche de staphylocoque non entérotoxique, demeurèrent absolument normaux.

De ce bref exposé, qui confirme toute la valeur des tests sur le jeune chat [3] et sur la grenouille, nous retiendrons spécialement le fait que, conformément aux observations antérieures [4], l'entérotoxine staphylococcique, thermostable, non détoxiquée par le formol et non antigénique, se distingue entièrement des exotoxines véritables. N'y a-t-il pas lieu de la rapprocher du poison convulsivant, thermostable et non antigénique, contenu dans la toxine botulique D, récemment étudiée par Prévot et Brygoo [5] ? Ces auteurs ont émis l'hypothèse qu'il s'agit d'amines de décarboxylation. La même hypothèse peut être soulevée au sujet de l'entérotoxine staphylococcique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Voir par exemple : R. KOURILSKY et P. MERCIER. *Rev. Immunol.*, 1942, 7, 53. — J. PILLET. Sur quelques produits élaborés par les staphylocoques pathogènes. *Thèse Fac. Méd. Paris*, 1948.
- [2] E. D. ROBINSON. *Proceed. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1949, 72, 265.
- [3] C. E. DOLMAN. *J. Immunol.*, 1938, 35, 13.
- [4] M. J. SURGALLA et K. E. HITE. *J. Infect. Dis.*, 1945, 76, 78. — Ch. GERNEZ-RIEUX, R. BUTIAUX et M^{lle} BROGNIART. *Presse Méd.*, 1947, 50, 565.
- [5] A.-R. PRÉVOT et E. R. BRYGOO. *Ces Annales*, 1950, 79, 1.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Recherches sur les facteurs qui conditionnent l'appartenance des bacilles paratyphiques B aux différents types bactériophagiques de Felix et Callow. — I. La lysogénéité des différents types de « Salmonella paratyphi B », par P. NICOLLE, Y. HAMON et E. EDLINGER.

Recherches sur les facteurs qui conditionnent l'appartenance des bacilles paratyphiques B aux différents types bactériophagiques de Felix et Callow. — II. Obtention expérimentale, à partir des cultures non lysogènes, des types de « S. paratyphi B » au moyen des bactériophages extraits des cultures lysogènes, par Y. HAMON et P. NICOLLE.

Influence exercée par la phagocytose de bacilles de Koch vivants ou tués et par une fraction lipopolysaccharidique isolée de ces bacilles sur les phénomènes de migration leucocytaire « in vitro », par Nine CHOUCROUN, A. DELAUNAY, S. BAZIN et R. ROBINEAUX.

Les facteurs antigéniques du vibron cholérique et leur détermination par agglutination microscopique, par A. WAHBA (présentée par J. GALLUT).

Action de la congélation prolongée sur la vitalité de tumeurs spontanées de la Souris, par P. LÉPINE, G. BARSKI et L. REINIE.

Effet du benzoate et du salicylate sur la respiration des bacilles tuberculeux virulents et avirulents, par A. ANDREJEV.

Sensibilité aux antibiotiques de 700 souches de germes aérobies titrées en 1950, par Y. CHABBERT.

L'élimination des germes banaux dans les crachats recueillis directement ou par tubage gastrique et destinés à la culture du bacille de Koch. Applications de certains perfectionnements à l'ensemencement de 6 500 tubes de milieux à l'œuf, par F. TISON.

Action du 2,3 dimercaptopropanol (BAL) seul ou associé au chloramphénicol ou à l'auréomycine sur quelques bactéries à Gram-négatif, par G. RENOUX et J. ROUX.

Hémagglutination par le virus de la variole aviaire, par J. VIEUCHANGE et E. LAVAL.

AVIS

Les Bibliothèques de l'Institut Pasteur viennent d'éditer le catalogue des congrès et des périodiques qu'elles possèdent. S'adresser à la Bibliothèque de l'Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV^e). Prix : 150 fr. (Compte chèque postal : Paris 336-94, ou coupon-réponse international).

LIVRES REÇUS

Charles H. Cunningham. — *A laboratory guide in virology*. Burgess Publishing Co Minneapolis, 70 pages, 27,5 × 21 cm.

Il s'agit là d'un guide destiné aux travaux pratiques des étudiants suivant aux Etats-Unis l'enseignement spécial des techniques de virologie. Il se présente sous l'aspect de feuillets ronéotypés réunis par une reliure souple, faciles à consulter, contenant des schémas clairs des méthodes d'inoculation, des protocoles d'expériences, des modes opératoires pour les titrages et déviations de complément, etc. Mais c'est en même temps plus et mieux qu'un simple memento de tra-

vaux pratiques. La clarté et la précision des méthodes exposées, les références bibliographiques qui accompagnent chaque exercice et le rappel des principes qui les inspirent font de cet ouvrage un véritable petit traité de techniques qui a sa place dans tout laboratoire de diagnostic des virus aussi bien que dans les services d'enseignement. Il va de soi, du reste, que le niveau de l'enseignement et la qualité des travaux pratiques dépassent de beaucoup ce qui serait donné en Europe, en France tout au moins, à des étudiants en médecine. La formation à laquelle correspondent les travaux pratiques envisagés est déjà celle d'un spécialiste qualifié. Peu de critiques à adresser à l'ouvrage si ce n'est l'usuelle limitation des références à celles de langue anglaise ou le maintien en matière de diagnostic de la rage de techniques traditionnelles au Nouveau Monde (frottis et colorations par la méthode de Sellers) qui ne sauraient être considérées comme les meilleures. Ce sont, il faut le reconnaître, des critiques de minime importance. Par ailleurs, toute la partie sérologique, si complexe pour les débutants, est de premier ordre. L'ensemble forme un excellent modèle dont on souhaiterait voir s'inspirer bien des responsables d'un enseignement sur les virus.

P. L.

Medical Research Council, special report series, n° 270. — *Reports on Biological Standards : VI. The Design of Toxicity Tests*, London : His Majesty's Stationery Office, 1950, 50 pages, prix : 1 s 6 d.

L'auteur passe en revue les différentes méthodes permettant d'apprécier la toxicité d'un produit quelconque et discute leur valeur.

Medical Research Council, Memorandum, n° 24. — *The causes of blindness in England and Wales*, London : His Majesty's Stationery Office, 1950, 41 pages, prix : 1 s 6 d.

Deux causes importantes de cécité ont été éliminées ou notablement réduites au cours des dernières années : la variole, qui jusqu'à 1872 était responsable des deux tiers des cas, et l'infection des nouveau-nés dont le pourcentage est maintenant considérablement réduit du fait des précautions prises au moment de la naissance et de l'emploi des sulfamides et de la pénicilline. Cependant, d'une part, la proportion des aveugles augmentant avec l'âge, et le nombre des vieillards s'élevant régulièrement au cours des dernières années, d'autre part le dépistage étant de plus en plus poussé, la diminution du nombre des cas apparaît moins importante qu'elle ne l'est en réalité. Les différentes causes de cécité aux divers âges et chez les deux sexes sont étudiées et les perspectives d'avenir examinées.

Medical Research Council, Memorandum, n° 21. — *List of Species Maintained in the National Collection of Type Cultures*, London : His Majesty's Stationery Office, 1950, 16 pages, prix : 9 d.

Depuis le 1^{er} janvier 1950, un certain nombre de cultures, faisant jusque-là partie de la Collection nationale, ont été transférées à des

organismes industriels ou agricoles spécialisés et cette seconde édition de la présente liste ne comporte plus que les germes intéressant les travailleurs de laboratoire dans le domaine médical et vétérinaire. Ces cultures sont à la disposition des chercheurs des Universités, laboratoires de recherches, etc. Les milieux propres à leur conservation sont indiqués dans la liste pour chacune d'elles. Dans un proche avenir, les germes pourront être expédiés sous forme de cultures desséchées.

Hans Schmidt. — *Fortschritte der Serologie*, Verlag von Dr Dietrich Steinkopff, Darmstadt, 1950.

Quatrième fascicule de la série étudiant les différents antigènes des streptocoques, les toxines bactériennes et les poisons animaux (serpents, scorpions, abeilles, etc.), ainsi que les antigènes hétérologues (Forsman).

Brucellosis. — A Symposium under the Joint Auspices of National Institutes of Health of the Public Health Service, Federal Security Agency, United States Department of Agriculture, National Research Council ; september 22-23, 1949, Bethesda, Maryland. American Association for the Advancement of Science, Washington, 1950, 271 pages, 23 × 15 cm.

Ce symposium, publié sous la direction de C. L. Larson et de M. H. Soule, est le résultat de la coopération de 24 collaborateurs, chacun d'eux ayant traité la question pour laquelle il avait une compétence particulière. L'ensemble constitue une étude très approfondie du sujet envisagé sous le triple point de vue bactériologique, clinique et expérimental. Après avoir passé en revue les différents genres de *Brucella*, les maladies qu'ils provoquent chez l'homme et chez les différentes espèces animales naturellement ou expérimentalement sensibles, les auteurs étudient l'immunologie, les tests de laboratoire et la thérapeutique et en particulier les résultats, qui semblent prometteurs, obtenus avec la chloromycétine et l'auroéomycine chez l'homme. Deux chapitres sont consacrés à la brucellose à Porto-Rico et au Canada. Enfin la question de la vaccination des animaux par la souche 19 fait l'objet d'une étude particulière. Chaque article est suivi de sa bibliographie et un index bibliographique complète le volume.

Liebig and after Liebig. — *A Century of Progress in Agricultural Chemistry*. American Association for the Advancement of Science, Washington, 1942, 111 pages, 26 × 18 cm.

Ce volume réunit toutes les communications qui ont été présentées devant les Sections de Chimie et d'Agriculture de l'American Association for the Advancement of Science le 30 décembre 1940, lors de la commémoration du 100^e anniversaire de la publication de l'ouvrage de Liebig « Organic Chemistry in its applications to Agriculture and Physiology ». Après une introduction qui retrace le caractère de Liebig, sa forte personnalité et son extraordinaire activité dans le domaine de la recherche et de l'enseignement, deux séries d'articles, la première sur la chimie organique, les enzymes et la nutrition, la seconde sur

les sols, les engrais et les besoins des plantes en substances minérales, passent en revue les principales découvertes de Liebig dans ces domaines, découvertes qui ont entraîné une profonde révolution dans la science de l'agriculture et des conséquences importantes pour la recherche moderne.

Inventaires du Matériel d'Enseignement Scientifique, vol. III, fasc. 1, Unesco, Paris, 1950, 99 pages, prix : 350 fr.

Sous l'égide de l'UNESCO, il est procédé, par le soin d'experts de pays considérés généralement comme étant en tête du progrès dans le domaine de l'enseignement scientifique, à l'inventaire du matériel d'enseignement pouvant servir à établir un programme de travaux pratiques et de manipulations complétant un cours dont le programme succinct est également donné.

La présente brochure, qui constitue le premier fascicule du 3^e volume de cet inventaire, porte sur l'enseignement des sciences vétérinaires. Une première partie envisage les programmes d'étude dans les différents pays : remarquons au passage qu'entre les extrêmes représentés par la Thaïlande qui forme des vétérinaires en trois ans et la Finlande qui exige six ans d'études, la très grande majorité des pays considère que cinq ans d'études sont nécessaires pour former les élèves à l'art vétérinaire. Quant au programme des études, il subit l'inflation commune à cette sorte d'enseignement et tend à devenir encyclopédique. L'inventaire proprement dit du matériel nécessaire à la réalisation de ces cours occupe la presque totalité de l'ouvrage, chaque instrument ou produit nécessaire aux travaux d'une classe de 100 élèves manipulant par groupes de 20 étant minutieusement inventorié et son prix évalué en dollars, depuis la chambre froide avec compresseur de trois tonnes jusqu'aux capuchons de caoutchouc pour les tubes à essai. Nous apprenons ainsi qu'il en coûte \$ 15 394,70 d'appareils de laboratoire pour donner aux élèves quinze heures d'exercices pratiques sur les maladies microbiennes des pays chauds, en des manipulations au cours desquelles 50 élèves consommeront, entre autres produits chimiques dont la liste occupe plusieurs pages, pour \$ 0,80 de sulfite de sodium cristallisé pur. En dépit ou à cause de la minutie de l'énumération, cet inventaire rendra service aux éducateurs pour préciser le type d'enseignement généralement donné et leur indiquer l'ordre de grandeur des différentes dépenses d'équipement et de consommation que représente l'organisation des travaux pratiques correspondants.

P. L.

E. J. King. — *Micro-Analysis in Medical Biochemistry*, second edition, J. and A. Churchill Ltd. 104 Gloucester Place, London W. 1, 1951, 222 pages, prix : 14 s.

Ce livre de micro-analyses est destiné plus aux laboratoires cliniques qu'aux chercheurs. Clairement rédigé et d'une présentation impeccable, il expose successivement les techniques de micro-analyse appliquées à l'examen du sang, du plasma, du sérum, du liquide céphalo-rachidien, des matières fécales, des urines, des calculs rénaux et biliaires, du contenu intestinal et duodénal, des différentes fonctions

excrétoires. Différents chapitres étudient les méthodes spectroscopiques, la détermination du pH, la préparation des solutions volumétriques ainsi que les méthodes de mesures colorimétriques et photométriques. Des listes de références et poids atomiques complètent l'ouvrage. A propos de chaque type d'analyse, l'auteur énonce clairement le principe de la méthode, la technique à suivre et le mode de calcul pour arriver à la lecture du résultat final, les constantes normales du produit analysé étant données par ailleurs dans des tables. Tel qu'il est, ce livre doit être un utile auxiliaire des laboratoires d'analyses biologiques.

P. L.

Le Gérant : G. MASSON.